Aus der Strahlenabteilung des Städtischen Auguste-Viktoria-
Krankenhauses Berlin-Schöneberg
Dirig. Arzt: Priv. Doz. Dr. med. W. Frommhold

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE EINWIRKUNG VON RADIOAKTIVEM PHOSPHOR - AUF TUBERKULOSEBAKTERIEN

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

1961

vorgelegt von
Barbara Loerbroks
aus Berlin

Druck:
ERNST-REUTER-GESELLSCHAFT
der Förderer und Freunde der Freien Universität Berlin e.V.
DISSERTATIONS-DRUCKSTELLE
1 Berlin 33, Garystr. 45

Aus der Strahlenabteilung des Städtischen Auguste-Viktoria-
Krankenhauses Berlin-Schöneberg
Dirig. Arzt: Priv. Doz. Dr. med. W. Frommhold

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE EINWIRKUNG VON RADIOAKTIVEM PHOSPHOR AUF TUBERKULOSEBAKTERIEN

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Barbara Loerbroks
aus Berlin

Dekan: Professor Dr. med. Helmut Selbach
Referent: Priv. Doz. Dr. med. W. Frommhold
Korreferent: Professor Dr. B. Schmidt

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 20. 7. 1961

Inhaltsübersicht

		Seite
1	Einleitung	7
2	Eigene Untersuchungen	18
21	Aufgabenstellung	18
22	Biologisches Material und biologische Methoden	19
221	Untersuchte Stämme	19
	Tab. 221-1	20
222	Nährböden - Zusammensetzung und Herstellung	21
2221	Grundnährböden	21
2222	Chemotherapeutikahaltige Nährböden	23
2223	Radioaktive Nährböden	23
	Tab. 2223-1, 2223-2, 2223-3 2223-4	25
223	Beimpfung der Nährböden	26
224	Resistenzbestimmungen	26
	Tab. 224-1	26
	Tab. 224-2	26
225	Tierversuch	27
226	Katalase-Versuch	27
227	Testgefäße	28
2271	Reagenzgläser	28
2272	Petrischalen	28
	Abb. 2272-1	28
	Abb. 2272-2	29
2273	Doppelröhrchen	29
	Abb. 2273-1	30
228	Mikroskopische Präparate	31
23	Physikalisches Material und physikalische Methoden	32
231	Radioaktiver Phosphor P-32	32
232	Meßtechnik	32
233	Strahlenschutz	32

Seite

3 Beschreibung der Versuche und Versuchsergebnisse 34

31 TB-Wachstum auf P-32-haltigen festen Nährböden 34

311 H 37 und Ro auf P-32-haltigen Nährböden 34
in Reagenzgläsern
Abb. 311-1 35

312 H 37, Ro, Ur und Hä 36
auf P-32-haltigen Nährböden in Reagenzgläsern
Abb. 312-1 37

313 H 37, Ro, Ur und Hä 38
auf P-32-haltigen Nährböden in Petrischalen
ohne und mit Membranfilterauflage
Abb. 313-1 40

314 H 37, Ro, Ur und Hä sowie BCG, Hr, Ho und Bl 41
auf P-32-haltigen Nährböden in Reagenzgläsern
Abb. 314-1 42

315 H 37, BCG, Ro und Hä 43
auf P-32-freien Grundnährböden
unter P-32-Bestrahlung in Doppelröhrchen

32 Überblick über das Ergebnis der Versuche 44
311 - 315:
TB-Wachstum in Gegenwart von P-32
Tab. 32-1 44

33 P-32-Aufnahme der TB 47
aus P-32-haltigen festen Nährböden

331 Leerversuche: P-32-Absorption in Membranfil- 47
tern
Abb. 331-1 48

332 H 37, Ro, Ur, Hr, Ho und Bl 50
in Petrischalen auf Membranfiltern:
P-32-Aufnahme aus festen Nährböden
Abb. 332-1 51

34 TB-Wachstum auf glyzerinhaltigen und glyzerin- 53
freien Nährböden nach Exposition auf P-32-haltigen
Nährböden mit Glyzerin
Abb. 34-1 54
Abb. 34-2 56

35 Katalase-Aktivität der TB
nach Exposition auf P-32-haltigen Nährböden 57
Tab. 35-1 58

Seite

36 Chemoresistenz der TB nach Exposition auf P-32-haltigen Nährböden 59

361 Chemoresistenz der TB ohne radioaktive Exposition 59
Tab. 361-1 60
Tab. 361-2 61
Tab. 361-3 62

362 Chemoresistenz der TB nach radioaktiver Exposition 64
Tab. 362-1 65
Tab. 362-2 66
Tab. 362-3 68
Tab. 362-4 70

4 Besprechung der Unterschungsergebnisse 71
Tab. 4-1 75

5 Zusammenfassung 80

6 Literaturverzeichnis 83

1 Einleitung

Die folgende Arbeit bewegt sich auf der Grenze zwischen der Physik - im engeren Sinne der Strahlenphysik - und der Biologie, vertreten durch die Bakteriologie. Gegenstand der Untersuchung ist innerhalb eines gegebenen Bereiches die Wechselwirkung zwischen der energiereichen Strahlung des künstlich radioaktiven Phosphorisotops P-32 und einem Mikroorganismus, dem Mycobacterium tuberculosis.

Fast unmittelbar im Anschluß an die Entdeckung der X-Strahlen und der Radioaktivität wurde bereits der schädigende, ja zerstörende Effekt der kurzwelligen elektromagnetischen Strahlen auf die lebende Zelle beobachtet, und die Strahlenbiologie, die Erforschung der Strahlenwirkung auf lebende Organismen, nahm von da ihren Ausgang. Die Bakteriologie war zur Zeit Röntgens und Becquerels noch eine sehr junge Wissenschaft, die sich zunächst vor allem mit der Auffindung und Morphologie lebender Erreger sowie mit dem Infektionsmodus und der Epidemiologie der durch sie erzeugten Krankheiten befaßte. Die neu entdeckte Strahlung erregte frühzeitig das Interesse der Bakteriologen, als sich herausstellte, daß sie Bakterien zu töten vermochte. Allerdings waren dazu sehr große Strahlendosen erforderlich, und ihre praktische Anwendung zur Entkeimung von Lebensmitteln, Medikamenten, Verbandstoffen ist erst in jüngster Zeit u. a. durch die Fortschritte der Kernphysik in der Darstellung künstlich radioaktiver Isotope als Quelle hoher Energie möglich und erfolgversprechend geworden. Mit der Analyse der tödlichen Wirkungen von Röntgen- und Radiumstrahlen wurde dagegen schon vor der Entdeckung der künstlichen Radioaktivität begonnen. Biologisch konnte es sich um eine Inaktivierung der physiologischen Zelltätigkeit (z. B. der Atmung), eine Wachstums- oder Fortpflanzungs- (Teilungs-)hemmung oder um die Entstehung einer lebensunfähigen Zellgeneration - bei Bakterien z. B. in Form des Verlustes der Koloniebildungsfähigkeit - handeln. Von seiten der Physiker wurde die ursprüngliche Auffassung, daß die beim Auftreffen der Strahlung auf Materie durch Umwandlung der kinetischen Energie entstehende Wärme das Absterben der Zelle herbeiführe, später durch die sogen. Treffertheorie abgelöst, wonach sowohl die elektromagnetischen als auch die korpuskularen energiereichen Strahlen in der Materie entweder durch sekundäre oder durch direkte Auslösung atomarer Elementarakte wirksam werden. In Abhängigkeit von der Zahl und Lokalisation der Treffer im bestrahlten Objekt entsteht ein bestimmter strahlenbiologischer Effekt, für den z. B. die Qualität der Strahlung nur insofern eine Rolle spielt, als sie die Trefferwahrscheinlichkeit beeinflußt.

Bei der Bestrahlung lebender Materie muß nicht immer der Zelltod eintreten. In den Jahren 1927/28 wurde durch Mullers Untersuchungen an Drosophila die mutagene Wirkung der ionisierenden Strahlen als eine für sie charakteristische strahlenbiologische Eigenschaft bekannt. Die Feststellung, daß es bei der Taufliege nach Röntgenbestrahlung zu einer Steigerung der spontanen Mutationsrate um das 100fache und

mehr kam, wurde zum Ausgangspunkt der Strahlengenetik (Nachtsheim). Die Einführung von Mikroorganismen (Bakterien und Phagen bzw. Viren) als genetisches Material erwies sich aus verschiedenen Gründen als vorteilhaft: Die schnelle Generationenfolge führt innerhalb kurzer Zeit (und auf begrenztem Raum) zu statistisch auswertbaren Ergebnissen; alle Individuen eines "Klons" oder einer Kolonie sind, bei entsprechender Methodik, Nachkommen eines einzigen Individuums, so daß neue Varianten nur auf Grund erblicher Unterschiede entstanden sein können; schließlich liegen die Erbanlagen bei den Mikroorganismen überwiegend in der haploiden Form vor, so daß dominante wie rezessive Mutationen sofort oder nach einer gewissen Zeit, in der sogen. prämutative Vorgänge ablaufen, manifest werden (Kaplan). Die Voraussetzungen für die Einbeziehung der Bakterien und Viren in die genetische Forschung sind erst nach dem ersten und während des zweiten Weltkrieges durch eine Reihe experimenteller Arbeiten geschaffen worden. Während die Bakterien bis dahin als zellkernfrei und asexuell galten, wurde durch die Feulgensche Nuklealreaktion im Jahre 1924 ein spezifischer histochemischer Nachweis für das Vorhandensein von Desoxyribonukleinsäure (DNS) erbracht (Feulgen und Rossenbeck); durch eine von Piekarski und Robinow angegebene modifizierte Giemsafärbung nach vorheriger partieller Hydrolyse ließen sich die DNS-tragenden Chromatinstrukturen darstellen, und schließlich gelang es mit der Methode von Brachet, auch bei Mikroorganismen nach Depolymerisation der RNS mittels Ribonuklease bzw. der DNS mittels Desoxyribonuklease durch ein Farbgemisch von Methylgrün-Pyronin die zytoplasmatisch verteilte RNS von den DNS-tragenden Chromatinstrukturen zu trennen. Weiterhin ergab die Analyse der Erbfaktorübertragung beim Bact. coli durch Tatum und Lederberg (1946) das Grundschema einer Bastardisierung, also Sexualitätserscheinungen, mit Rekombination der Merkmale ähnlich wie bei Drosophila, was schließlich zur Aufstellung einer "Chromosomenkarte" mit 8 linear angeordneten Erbmerkmalen für den Colistamm K 12 führte. Luria und Delbrück erklären die Ergebnisse ihrer Versuche mit Bakteriophagen ebenfalls durch "Vorgänge sexueller Art", und in Analogie zu den Hefen, bei denen sich alle Übergänge vom Überwiegen einer diploiden Phase über wechselndes Verhalten bis zum völligen Verlust der Sexualität bei der Torula finden, ist die Hypothese aufgestellt worden, daß auch bei den verschiedenen Bakterien und Viren der Verlust der Sexualität phylogenetisch mehr oder weniger weit fortgeschritten sein kann (Boivin). Unter bestimmten Bedingungen, so z. B. durch UV-Bestrahlung der einzelnen Mutanten vor der Anlage der Mischkultur bei Colibazillen, kann eine Zunahme geschlechtlicher Vorgänge erreicht werden (Haas, Wyss und Stone; Hayes).

Mutationen, d. h. sprunghafte, irreversible und ungerichtete Veränderungen einzelner oder mehrerer Erbfaktoren, kommen bei allen Arten von Mikroorganismen ebenso wie bei den höheren Lebewesen mit einer bestimmten, bezogen auf die Einzelzelle sehr niedrigen Spontanrate von ca. 10^{-8} bis 10^{-6} vor. Die Mutationen sind voneinander und grundsätzlich auch von den Kulturbedingungen unabhängig. Der Art nach können sie morphologische oder biochemische Eigenschaften der Mikroorganismen betreffen. Von besonderem medizinischem Interesse ist

u. a. die mutative Entstehung der Fähigkeit zur Bildung von Antibiotika sowie das Auftreten einer Resistenz der Bakterien gegen physikalische (z. B. Röntgenstrahlen), chemische (z. B. bakteriostatische Substanzen) oder biologische (z. B. Bakteriophagen) schädigende Einflüsse oder die positive oder negative Veränderung des pathogenen Charakters von Pilzen, Bakterien und Viren (Kaplan; Boivin; Delbrück, Fanno und Luria; Demerec und Latarjet).

Bei der Provokation von Mutationen durch ionisierende Strahlen zeigt sich, daß die induzierten Erbänderungen, die qualitativ den spontan auftretenden entsprechen, in niedrigen Dosisbereichen überwiegend direkt proportional zur Strahlendosis entstehen, d. h. einer sogen. Eintrefferkurve folgen (Lincoln 1940, Demerec 1946, Kaplan 1956 u. a.) und wahrscheinlich im allgemeinen Genmutationen sind. Erst bei höheren Strahlendosen wird die Dosis-Effekt-Kurve konkav, woraus auf Mehrtreffervorgänge, möglicherweise in Form von Chromosomenumbauten, zu schließen ist. Die Ergebnisse der Untersuchungen über Dosiskurven und Mutationswahrscheinlichkeiten lehrten jedenfalls, daß es sich bei den sogen. Rezeptoren der Treffer um submikroskopische Gebilde in der Größenordnung von Makromolekülen, Enzymen, Viren handeln dürfte.

Die Beobachtung, daß z. B. beim UV-Spektrum die Wellenlänge der maximalen Mutationsrate bei direkter Bestrahlung dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäure entspricht (Hollaender 1939 u. a. später), legte einen Zusammenhang zwischen der Mutationsauslösung und der Absorption der Energie durch die Nukleinsäure nahe - die Nukleinsäure scheint der Träger der genetischen Spezifität zu sein (Gottschewski). So führen biophysikalische Analyse, biochemische Reaktionen und Mutationsexperimente zu der Auffassung, daß die erbliche Fundamentaleinheit, das Gen, wahrscheinlich sowohl bei den Bakterien als auch bei den höheren Lebewesen ein Makromolekül einer besonderen DNS ist, das die Fähigkeit der Autoreproduktion innerhalb spezifischer lebender Zellen besitzt.

Diese Erkenntnis von der Natur der Gene wird durch Versuche bestätigt, in denen es gelang, einen Typ einer bestimmten Bakterienart durch Züchtung im Kulturfiltrat eines anderen Typs derselben Bakterienart erbfest in jenen anderen Typ zu transformieren (Harm u. a.). Obwohl Griffith bereits 1928 die antigenen Eigenschaften einer virulenten S-Form eines vorher durch Hitze abgetöteten Pneumokokkentyps im Tierversuch auf die avirulente R-Form eines anderen Pneumokokkentyps übertragen konnte, gelang es doch erst nach vielen weiteren Beobachtungen bei Colibakterien, Dysenteriebakterien und aeroben Sporenbildnern des Milzbrandes und der Subtilisgruppe 1944 Avery und seinen Mitarbeitern nachzuweisen, daß das auslösende Agens derartiger "gerichteter Mutationen" die DNS desjenigen Keimes ist, welcher dem anderen seine Eigenschaften induziert, wobei die Säure nur im nicht depolymerisierten Zustand wirksam ist. Nach Boivin hat das "Phänomen der gerichteten Mutationen die außerordentlich wichtige Erkenntnis einer aufs engste an die DNS als Induktor geknüpften biologischen Spezifität erbracht", so daß also in der Natur das Vorhandensein sehr zahlreicher verschiedener DNS anzunehmen ist.

Durch die Virusforschung ist noch eine weitere Möglichkeit der Rekombination von genetischem Material bei Bakterien ohne Zellkontakt gefunden worden, nämlich die sogen. Transduktion durch Bakteriophagen - nach Harm 1952 von Zinder und Lederberg bei Salmonella typhimurium entdeckt. Experimentell läßt sich im übrigen nicht nur nach Darstellung der Nukleinsäure des Tabakmosaikvirus aus den Komponenten Protein und Nukleinsäure ein aktives Virus restituieren, es läßt sich auch zeigen, daß die RNS des Tabakmosaikvirus für sich allein schon infektiös sein kann, wenn auch geringer, als das wieder rekonstruierte Virus (Gierer und Schramm; Fraenkel-Conrat).

Inzwischen hat die Elektronenoptik bereits die Übertragung des Erbmaterials durch eine Plasmabrücke von einer Zelle zur anderen sichtbar gemacht (Jacob und Wollman 1955 an Coli K 12; Kölbel 1957 an M. tbc. avium).

Vom medizinischen Standpunkt aus könnte man zusammenfassend sagen: Da der Begriff der "Infektion" sowohl das Eindringen des infizierenden Agens in den Wirtsorganismus, als auch seine Vermehrung darin umfaßt, diese Vermehrung aber eine Funktion der Nukleinsäure (in Form der DNS bei Phagen, Bakterien und höheren Lebewesen - in Form der RNS beim Tabakmosaikvirus und vielen anderen pflanzen- und tierpathogenen Viren) als des Trägers der "genetischen Information" an das zytoplasmatisch korrelierte Substrat ist, werden sich schließlich so komplexe Vorgänge wie Pathogenität, Infektion und Virulenz, Resistenz oder Sensibilität auf der einen Seite und Empfänglichkeit oder Immunität auf der anderen Seite schrittweise bis zur Größenordnung von Elementarakten analysieren lassen. Auf dem Boden derartiger Überlegungen gewinnen Einwirkungen, die mit einer gewissen Trefferwahrscheinlichkeit zur Auslösung von Elementarakten, im gegebenen Fall also zu einer Veränderung der "historisch entstandenen individuellen Gen-Substrat-Umwelt-Korrelation" (Gottschewski) führen, erheblich an Interesse.

Die Linearität der Dosis-Effekt-Kurve besagt zwar, daß es für die strahleninduzierten Gen-Mutationen keinen Schwellenwert gibt; es müssen aber die entstandenen Abweichungen innerhalb der Population quantitativ oder qualitativ eine gewisse "Schwelle" überschreiten, um erfaßbar zu werden. Dabei hängt es von der Feinheit bzw. von der Auswahl der Methoden in einer bestimmten Versuchsanordnung ab, wo diese "Schwelle der Erkennbarkeit" liegt. Wenn, wie im folgenden, während oder nach der Strahlenexposition z. B. eine "Wachstumshemmung" von Bakterien festzustellen ist, so sind wir uns darüber im klaren, daß damit über die Art der dieser Wachstumshemmung zugrundeliegenden Elementarveränderungen noch nichts ausgesagt ist. Anders ausgedrückt: gemessen an so groben vitalen Erscheinungen wie Wachstum oder Abtötung einer Bakterienkultur kann man von einer "unterschwelligen" Strahlendosis sprechen. Auf dieser Voraussetzung beruht die Anwendung radioaktiver Isotope in der Bakteriologie im Sinne der sogen. "Tracermethode".

Da sich die radioaktiven Elemente chemisch wie die inaktiven verhalten, ist es möglich, chemische Verbindungen durch Einführung eines radioaktiven Isotops zu "markieren", das sich durch Aktivitätsmessungen jederzeit erfassen läßt. Die prinzipielle Brauchbarkeit der Methode für Stoffwechseluntersuchungen wurde von Hevesy bereits 1923 gezeigt; Lehnartz weist in der 7. Auflage seiner "Einführung in die Chemische Physiologie" 1947 unter Zitierung von Hevesy sowie Schoenheimer und Rittenberg bereits auf die Bedeutung der radioaktiven Isotope für die Erforschung des Intermediärstoffwechsels hin; aber erst 1948 erschien die grundlegende Monographie über "Radioaktive Indikatoren" von G. Hevesy.

Ebenso wie für Untersuchungen des Intermediärstoffwechsels im Makroorganismus schien das Verfahren zur Klärung der Wirkungsweise von bakteriostatischen oder bakteriziden Substanzen in der Bakteriologie geeignet. Außerdem stellte sich heraus, daß der Mikroorganismus selbst durch "Inkorporation" eines radioaktiven Elementes, das man dem Kulturmedium zusetzt, "signiert" werden kann - eine verlokkende Möglichkeit, z. B. den Ausbreitungsweg eines Keimes im infizierten Wirt mit Hilfe von Aktivitätsmessungen zu verfolgen. Bei allen derartigen Versuchen ist aber eine Strahlenexposition des Mikroorganismus und damit nach den oben geschilderten Erfahrungen ein strahlenbiologischer Effekt unvermeidlich - d. h. bei der Versuchsanordnung wird bereits eine gewisse Veränderung des Versuchsobjektes in Kauf genommen. Die Diskussion der Ergebnisse hätte also davon auszugehen, daß die strahlenbiologischen Veränderungen entweder - qualitativ - nicht die untersuchten Funktionen betrafen, oder daß sie - quantitativ - nicht ins Gewicht fielen. Nach dem über das Trefferereignis und seine Folgen Gesagten dürfte ein solcher Nachweis im konkreten Falle recht schwierig sein.

In den Arbeiten, die sich mit der radioaktiven Markierung der Bakterien selbst befassen, finden wir nur wenige orientierende Hinweise auf diese Fragestellung. So empfehlen Spiess und Poppe, welche radioaktiven Phosphor als Indikator benutzten, auf Grund ihrer Erfahrungen "je nach Keimart, einen P-32-Zusatz von 10 - 30 µc pro ml Nährflüssigkeit, um eine genügende Aktivität und damit eine gute Nachweisbarkeit der Bakterien zu garantieren. Bei dieser Dosis werden Vitalität und Stoffwechsel der Erreger noch nicht so stark beeinträchtigt, daß sie absterben, was bei höheren spezifischen Aktivitäten eintreten kann. Die Möglichkeit der Strahlenschädigung durch die Beta-Strahlen des im Stoffwechsel aufgenommenen radioaktiven Phosphors muß selbstverständlich bei Stoffwechseluntersuchungen berücksicht werden!" Zur Sicherstellung der Inkorporation des radioaktiven Isotops haben Tuberkelbakterien "über 10 Tage, Kokken und E. coli mindestens 5 Tage in dem nach der Einsaat mit P-32 beschickten Nährboden" zu wachsen. J. Meissner und Kropp konnten in ihrer Untersuchung "Über die Phosphatresorption beim Mycobacterium tuberculosis" bei einer Aktivitätsdosis von 100 µc P-32 auf 300 ml Nährsubstrat (synthet. Lockemannlösung), "wie von vornherein nicht anders zu erwarten", einen Einfluß der Bestrahlung auf das Wachstum nicht feststellen. Die Bebrütungszeit betrug "in der Regel 10 Tage". Bei einer geringeren

Aktivität von 0,0023 bis 0,325 µc P-32/ml Nährboden fand O. A. Ross keine Veränderungen des Wachstums oder der Koloniebildung des Str. haemolyticus. Die folgerichtige Anwendung der oben dargestellten Leitgedanken zur Kritik derartiger Versuche ergibt, daß hier eine Inkongruenz besteht zwischen der Meßgröße (Wachstum bzw. Wachstumshemmung der Bakterien) und der sehr niedrigen Aktivitätsdosis (0,0023 bis 30 µc pro ml Nährmedium) einerseits und zwischen der Meßgröße und dem Gegenstand der Untersuchung (Bakterienstoffwechsel) andererseits. Bei der radioaktiven Markierung von Mirkoorganismen taucht aber noch ein weiteres Problem auf: die Frage der Beständigkeit der Verbindung "Bakterium - Tracer". Zu den frühesten Arbeiten auf diesem Gebiet gehören diejenigen von J. O. Ely, der zunächst E. coli und Staph. aureus, später eine große Zahl verschiedener Bakterien durch Züchtung auf P-32-haltigen Nährböden radioaktiv markierte und dann ihre Verteilung in den Organen des Makroorganismus (Albinoratten), u. a. in Abhängigkeit von verschiedenen Applikationsarten, untersuchte. Er stellte fest, daß nach 18stündigem Wachstum der Bakterien auf P-32-haltigem Agar mehr als viermaliges Waschen nicht zu einer weiteren Reduktion der Radioaktivität der ausgewaschenen Bakterienmenge führte und schloß daraus, daß P-32 in den Bakterienkörper in fester Verbindung aufgenommen worden sei. In der Diskussion seiner Ergebnisse weist er aber darauf hin, daß die geschilderte Methode der radioaktiven Bakterienmarkierung nur für "Kurzzeit-Experimente brauchbar" sei, da sonst durch den Stoffwechsel der Bakterien P-32 unabhängig vom Bakterienleib im Makroorganismus wandern könnte, außerdem auch damit zu rechnen sei, daß die Bakterien infolge der Reaktion des Makroorganismus "disintegrierten". Zur Ausschaltung dieser Fehlerquelle applizierte er einer Reihe von Kontrolltieren P-32 als Natriumphosphat auf den gleichen Wegen wie in den vorhergehenden Versuchen die P-32-haltigen Bakterien; die Tatsache, daß er danach eine andere Verteilung der Radioaktivität in den Organen der Ratte fand, als nach der Bakterieninjektion, sah er als Beweis dafür an, daß seine Aktivitätsmessungen im Hauptversuch wirklich die Verteilung der "markierten" Bakterien, und nicht etwa den "unabhängig von ihnen im Makroorganismus wandernden" P-32 erfaßt hatten.

Derartige Kontrollversuche erfordern aber eigentlich außer der Injektion von radioaktivem Natriumphosphat auch noch die gleichzeitige Injektion von nicht markierten Bakterien, da die Infektion möglicherweise direkt, wahrscheinlich aber im Zusammenhang mit der durch sie hervorgerufenen Stress-Situation im Hypophysen-Nebennierensystem indirekt über die Veränderungen des KH-Stoffwechsels u. a. auch den Phosphorstoffwechsel im Makroorganismus beeinflußt. Für die von Ely im besonderen untersuchte tuberkulöse Infektion stellte H. Müller 1954 in einem Übersichtsreferat eine Reihe einander z. T. stark widersprechender Resultate von Arbeiten aus früheren Jahren über das Verhalten des Blutphosphorspiegels bei verschiedenen Formen der Lungentuberkulose zusammen, so daß es lohnend erscheinen könnte, dieser Frage unter Anwendung von P-32 als Indikator nochmals nachzugehen. Tierexperimentelle Grundlagen dafür gaben Freerksen und J. Meissner in ihrer Studie über die Aufnahme und Verteilung radio-

aktiven Phosphates beim Kaninchen. Sie bezogen die Aktivitätskonzentration (AK) der verschiedenen Organe, gemessen in Imp/min/Gew.-einh., auf die AK des Gesamtblutes in Imp/min/Gew. einh. und erhielten auf diese Weise vergleichbare Werte, weil sich der Quotient AK des Organs zu AK des Gesamtblutes als weitgehend unabhängig von der applizierten Dosis, vom Anteil der Ausscheidung und von der Applikationsart erwies. Dagegen zeigte die AK des Gesamtblutes nach i. v. Injektion von $Na_2HP^{32}O_4$ einen beträchtlichen Streubereich, war durch unspezifische Faktoren wie Fütterungszeiten, Unterkühlung und Überhitzung beeinflußbar und stellte im übrigen eine Resultierende aus einer Reihe sehr verschiedener komplexer Vorgänge dar, unter denen neben der Applikationsart und Ausscheidungsrate nach der Auffassung der Autoren auch die Phosphorylierungsprozesse in den Zellen eine Rolle spielen. In einer späteren zusammenfassenden Arbeit über "Radioisotope bei Markierungs- und Stoffwechselversuchen an Bakterien" wandte J. Meissner diese Quotientenberechnung zur Korrektur der von Ström und Mitarb. gemachten Angaben über die Verteilung P-32-signierter Tuberkelbakterien (TB) im Organismus des Meerschweinchens an. Ström und Rudbäck sahen zwar eine Fehlerquelle in der "Tatsache, daß wir nicht feststellen können, bis zu welchem Grade die tatsächlich gemessene Aktivität (in den Meerschweinchenorganen) der an den Bakterienkörper gebundenen entspricht und wieweit sie von radioaktivem Phosphor herrührt, der von den Bakterien in die Gewebe abgewandert ist" - sie meinten aber, es sei "reasonable to assume that the ratio between the various values of activity also is the ratio between the amounts of bacteria which have become more or less firmly fixed in the various organs". In seiner oben erwähnten Stellungnahme betont J. Meissner, es sei "unvermeidlich, die Aussagen über die Verteilung markierter Erreger auf signifikante Unterschiede gegenüber der Phosphatverteilung im Organismus zu beschränken"; er vergleicht daher die aus den Angeben von Ström und Mitarb. errechneten Quotienten Organ-AK zu Gesamtblut-AK mit den von ihm nach Phosphatapplikation beim Kaninchen gefundenen Verhältnissen und kommt zu dem Schluß, daß "mit Sicherheit eine stärkere Anreicherung der Aktivität in Milz und Knochenmark nach Applikation der markierten Bakterien zu erkennen" ist, während die Speicherung der Niere unter den Werten der Tiere mit Phosphatapplikation bleibt.

Obwohl auf diese Weise die Präzisierung der Ergebnisse von Untersuchungen mit radioaktiv markierten Erregern im Vergleich zu früheren Arbeiten erheblich verbessert ist, scheint doch noch der Schlußstein in der Beweiskette zu fehlen: eben eine Untersuchung darüber, ob und wieweit außer dem Blutspiegel auch der Aufnahmequotient der Organe nach Phosphatapplikation durch die Invasion von TB, also durch die tuberkulöse Infektion des Makroorganismus verändert wird.

Das zugrundeliegende allgemeine Problem der Stabilität der "Verbindung Bakterium - radioaktiver Tracer" ist aber noch von einer anderen Seite her angegangen worden. Bei genauer Kenntnis des Eigenstoffwechsels der jeweiligen Bakterienart scheint es naheliegend, zu ihrer Markierung radioaktive Elemente zu wählen, die nicht oder nur langsam wieder ausgeschieden werden, und den Zeitraum zu bestimmen,

in dem mit einem Bestehenbleiben der Verbindung zwischen Erreger und Indikator zu rechnen, ein "Tracer-Versuch" also durchführbar ist. Schon Ely hatte ja die Methode der radioaktiven Bakterienmarkierung als nur für Kurzzeitexperimente brauchbar bezeichnet. Auch bei Spiess und Poppe spielt der Zeitfaktor eine Rolle. Sie beobachteten 40 Std. nach i.v. Injektion von TB, die mit P-32 markiert waren, im Kaninchenversuch einen erheblichen Aktivitätsanstieg im Knochen, besonders in den Wachstumszonen. Sie führten diese Erscheinung auf die "bekannte Affinität des P-32 zu Knochen und gut durchbluteten Wachstumszonen" zurück, weil "zu dieser Zeit nämlich durch den Bakterienstoffwechsel bereits so viel P-32 wieder abgegeben ist, daß man die vermehrte Radioaktivität in Leber, Milz und Knochen nicht mehr auf die Bakterienablagerung, sondern auf den frei gewordenen radioaktiven Phosphor beziehen muß". In derselben Mitteilung heißt es jedoch im Anschluß an die Beschreibung der Befunde 1 Std. p.i.: "3 Std. später (also im ganzen 4 Std. p.i.) ist eine zunehmende Bakterienanreicherung in Leber, Milz und Knochen festzustellen" - wirklich festgestellt wurde aber nur eine Aktivitätsanreicherung in diesen Organen. Ohne mikroskopische oder besser quantitative kulturelle Kontrolluntersuchungen, auf die sich kein Hinweis findet, scheint der Schluß, daß es sich zu diesem Zeitpunkt um eine Bakterienanreicherung handelt, nicht zwingend; es ist doch denkbar, daß durch den Stoffwechsel der Mycobakterien bereits unmittelbar nach ihrer Einverleibung in den Makroorganismus radioaktiver Phosphor freigesetzt und gemäß seiner Organ- bzw. Gewebsaffinität gespeichert wird. J. Meissner schlägt für die experimentelle Praxis ein relativ einfaches Verfahren zur Prüfung der Stabilität des Einbaues eines radioaktiven "Tracers" in den Mikroorganismus vor: Die in der tracerhaltigen Nährlösung gezüchteten Bakterien werden abzentrifugiert und auf inaktive Nährböden überimpft; in Abhängigkeit von der Zeit läßt sich messen, wieviel von der mit den Impfbakterien eingebrachten Aktivität wieder in die Nährlösung abgegeben wird bzw. wieviel an die Bakterien gebunden bleibt. Die Anwendung dieser Versuchsanordnung auf TB und P-32 zeigte bei einer Zunahme des Bakteriengewichtes um zwei Größenordnungen nach 21 Tagen nur noch 16 bis 39% der Ausgangsaktivität an die Bakterien gebunden, also über die Hälfte an die Nährlösung abgegeben. Andere zeitliche Intervalle wurden nicht untersucht, doch weist der Autor mit Recht darauf hin, daß die Abbaurate im Tierversuch infolge der Abwehrreaktion des Makroorganismus noch größer sein dürfte, als in vitro.

Es scheint daher günstiger, meint j. Meissner, TB mit S-35 zu markieren, während z. B. Colibakterien nach Labaw und Mitarb. eine so stabile Bindung des P-32 beim Aufbau ihrer Nukleinsäuren zeigen, daß er sogar von abgetöteten Coli festgehalten wird. Analoges fand D. Koch-Weser für TB in Form des in der Methylgruppe mit C-14 markierten Acetats, das vorzugsweise zur Synthese von Leibessubstanz verwendet und damit als Indikator fest genug gebunden wird.

Aus allen diesen mit einer Reihe von Unsicherheitsfaktoren belasteten Ergebnissen geht hervor, daß Markierungsversuche an Mikroorganismen eine genaue Kenntnis ihres Eigenstoffwechsels voraussetzen. Hierzu bietet sich, ebenso wie in der Stoffwechselforschung des Makroorganismus, die von Hevesy ausgearbeitete Methode mit radioaktiven Indikatoren bestechend an. Damit nähern wir uns aber wieder jener eigentümlichen Situation, die im Anfang unserer Erörterung der "Tracermethode" bereits gestreift wurde und die man in Anwendung der Begriffe der Quantentheorie, in deren Größenordnungen wir uns ja bewegen, als Heisenbergsche Unschärferelation bezeichnen kann: Indem wir mit Hilfe der Radioaktivität den Stoffwechselweg eines Elementes im Mikroorganismus bestimmen, kann durch ein Energiequant eine Veränderung gerade an jenem Gen bewirkt werden, welches den für den untersuchten Stoffwechsel entscheidenden enzymatischen Vorgang steuert. Andererseits kann uns nur die Kenntnis des Stoffwechselweges eines Elementes im Mikroorganismus bzw. in der lebenden Zelle und die Analyse der biochemischen enzymatischen Reaktionen dieser Zelle in die Lage versetzen, über die Wahrscheinlichkeit des Eintretens und der Richtung einer durch einen atomaren Elementarakt hervorgerufenen biologischen Veränderung etwas auszusagen, in der Praxis also z. B. eine bestimmte Energiequelle zur Erreichung eines bestimmten Zweckes anzuwenden. Während in der Physik aus den statistischen Gesetzen der Quantentheorie "für den Vorgang im Großen eine so große Wahrscheinlichkeit folgt, daß man sagen kann, praktisch sei der Vorgang determiniert" (Heisenberg), zeichnen sich die komplexen Abläufe der Biologie ja gerade durch die "Unzuverlässigkeit" im Zusammenhang zwischen Ursache und Wirkung im Sinne der klassischen Physik aus. In der Indeterminiertheit sehen wir das Charakteristische der vitalen Reaktionen, die durch atomare Prozesse in der einzelnen Zelle gesteuert werden. Derartige Gedankengänge scheinen uns die folgerichtig mit den Erkenntnissen der theoretischen Physik vorschreitende Weiterentwicklung der "Molekularpathologie" zu sein, welche von H. Schade im Anfang des Jahrhunderts durch Anwendung physikalisch-chemischer Gesetzmäßigkeiten auf Physiologie und Pathologie an die Stelle der "Zellularpathologie" R. Virchows gesetzt wurde. In den Größenordnungen der "Quantenbiologie" liegt der Übergang von der Gestalt zur Funktion. Allerdings ist das "Grundproblem der Strahlenbiologie nicht gelöst", d. h. "wir kennen die vitale strahleninduzierte chemische Änderung in den Zellen noch nicht, die alle biologischen Prozesse einleitet" (P. Alexander). Aber die Möglichkeit, durch Veränderung einzelner atomarer Prozesse in der Zelle einen biologischen "Vorgang im Großen" zu beeinflussen, ist in der Medizin die eigentliche Voraussetzung u. a. für die chemische und Strahlenbehandlung der Geschwülste, für den sogen. chemischen Strahlenschutz, für die "Chemotherapie bakterieller Infektionen". Wir erinnern daran, daß bei geeigneten Schimmelpilzkulturen durch Bestrahlung eine Erhöhung der Mutationsrate für die Fähigkeit zur Produktion eines bestimmten Antibiotikums erzielt werden kann, und daß diese Erfahrung bei der Herstellung der Antibiotika wirtschaftlich ausgenutzt wird. In gewissem Sinne gehört auch die Auffindung der Para-Aminosalizylsäure als Tuberkulostatikum durch den Biochemiker Lehmann hierher, als

Beispiel dafür, wie die Beobachtung enzymatischer Reaktionsabläufe in der Zelle (in diesem Falle die Arbeiten Bernheims über die Rolle der Benzoesäure und der Salizylsäure beim oxydativen Stoffwechsel der TB) zu einem gezielten Eingreifen führen kann.

Ein für unser Thema wichtiges Stoffwechselproblem, die Frage der Phosphatresorption beim Mycobacterium tuberculoses, wurde von J. Meissner und Mitarb. aus dem Tuberkulose-Forschungsinstitut Borstel bearbeitet. Die Autoren kamen zu dem Ergebnis, daß "P-32-markierte Metaphosphate aus synthetischen Nährlösungen unmittelbar und gegenüber dem Orthophosphat gelegentlich bevorzugt vom Mycobact. tuberculosis aufgenommen werden können", und daß "die Kultur einen definierten Metaphosphatbedarf deckt, der unabhängig von ihrer Orthophosphataufnahme ist". Dabei war ein Zusammenhang zwischen der bevorzugten unmittelbaren Aufnahme P-32-markierter kondensierter Phosphate, der Häufigkeit der fluoreszenzmikroskopisch beobachteten Granula und dem analytisch bestimmten Gesamt-P-Gehalt der Bakterientrockensubstanz in dem Sinne nachzuweisen, daß bei Kulturen mit relativ großer Neigung zur Granulabildung Gesamt-P-Gehalt und Granulierung bis zur längsten beobachteten Bebrütungszeit von 4 Wochen etwa konform anstiegen, das Maximum der Phosphataufnahme bei diesen Kulturen aber bereits nach 12 Tagen erreicht war, während zu diesem Zeitpunkt der exponentiellen Wachstumsphase erst wenig oder gar keine Granula zu sehen waren. Daraus und aus dem folgenden steilen Abfall des P-32-Aufnahmequotienten schlossen die Verff. auf eine hohe Phosphorstoffwechselintensität der Granula und traten damit der üblichen Auffassung des Granulums als eines Phosphat- und Energiedepots entgegen.

An dieser Stelle schließt sich der Kreis unserer einleitenden Betrachtungen. Denn die Granula, oder besser gesagt bestimmte, färberisch durch die Feulgensche Nuklealreaktion und optisch im Phasenkontrastverfahren definierte Typen dieses "vieldeutigen Sammelbegriffes" (Bassermann), sind als DNS-haltige "Kernäquivalente", als "Träger der Erbsubstanz" anzusprechen (Kölbel). Dadurch erscheint der alte Streit um die Bedeutung der "Granula" des TB, um die Frage der sogen. "filtrierbaren Formen" und um das Problem der "Cyklogenie" in ganz neuem Licht, wenn wir uns an die eingangs dargestellte Definition des Gens als eines "Makromoleküls einer besonderen DNS, das die Fähigkeit der Autoreproduktion hat" erinnern, oder an die Möglichkeiten der "Induktion gerichteter Mutationen" und an die Ergebnisse der Suche nach der "kleinsten infektiösen Einheit". Angesichts der experimentellen Erfahrungen und der Hypothesen der heutigen Mikrobiologie des Mycobacterium tuberculosis ist es von großem historischem Reiz, bei Bassermann zu lesen, welche Vorstellungen sich Fontès auf Grund seiner 1910 veröffentlichten Filtrationsversuche mit tuberkelbakterienhaltigen Medien gemacht hat; danach ist die Funktion der Granula für das Leben des TB unentbehrlich, die Granula lassen neue Granula aus sich hervorgehen, die wiederum zu Vermehrungszentren werden, die Granula sind nicht allein Reproduktionszentren, sondern auch außerhalb des TB teilungsfähig, sie sind eine vitale Einheit.

Diese Formulierungen finden in den jüngsten Forschungsergebnissen ihre Parallelen: Die nuklealpositiven Granula, chemisch einen Ca-Metaphosphat-Komplex in Verbindung mit Nukleinsäure in Form der DNS, Eiweißkörpern und Lipoiden enthaltend, müssen als "Kernäquivalent" der Bakterienzelle und als "Träger der genetischen Information" angesehen werden, ihre Teilung ist bei bestimmten Vermehrungsformen (Mycelbildung, Längsteilung) des Tuberkelbakteriums beobachtet worden, ebenso ein Überwandern von "Phosphatgranula" über eine Plasmabrücke von einer Bakterienzelle zur anderen. Kölbel geht sogar im Spekulativen so weit, "den Granula im Endzustand ihrer Entwicklung auch eine gewisse Individualität zuerkennen" zu wollen, und es erscheint ihm "nicht ausgeschlossen, daß es späterhin einmal möglich sein wird, eine Brücke von diesen vielumstrittenen biologischen Einheiten zu den Viren zu schlagen". Nach Roulet mag "die Existenz granulierter Formen wie vielleicht auch freier Granula die Erklärung für die Latenz des tuberkulösen Infektes und damit auch für die Gefahr des Rezidivs abgeben". Andererseits ist die Granulierung des Tuberkelbakteriums eine "Reaktion gegen veränderte Milieubedingungen" (Kölbel), sie ließ sich durch Variation des Nährbodens (Herabsetzung des Glyzeringehaltes und Erhöhung des Phosphorgehaltes) provozieren, und sie beeinflußt ihrerseits wieder den Phosphorgehalt und die Metaphosphataufnahme der Bakterien. Der Zusammenhang mit "biologischen Vorgängen im Großen" deutet sich an z. B. bei Beobachtungen über eine Verminderung der Virulenz der gezüchteten Tuberkelbakterien bei Herabsetzung des Phosphorgehaltes im Nährboden auf 1/10 und 1/100 der Dubos-Vergleichslösung, was für eine "Virulenzvariation mit dem chemisch-analytischen Aufbau der Mycobacterien sprechen könnte" (J. Meissner), oder über die spezifische antigene Wirkung der Phosphatidsäure (Roulet, Domagk u.a.), die von den Mycobacterien aus den anorganischen Phosphaten synthetischer Nährlösungen aufgebaut wird.

Angesichts dieser komplexen Ergebnisse der neueren mikrobiologischen Forschung sind wir erneut versucht darauf hinzuweisen, daß uns vielleicht die folgerichtige Übertragung der Begriffe der Quantenphysik und -chemie auf die entsprechenden Größenordnungen in der Biologie weiterführen wird. Wir waren daher bemüht, in diesem Sinne einen Überblick über die unser Thema betreffende Literatur zu geben, wobei es sich freilich angesichts der schnell ansteigenden Zahl von Veröffentlichungen auf dem Gebiete der Strahlenbiologie nur um einen Ausschnitt handeln konnte.

2 Eigene Untersuchungen

21 Aufgabenstellung

Bei unseren eigenen Untersuchungen gingen wir von den in der Einleitung geschilderten Überlegungen zur Kritik von Markierungs- und Stoffwechseluntersuchungen an Bakterien mit radioaktiven Isotopen aus, daß nämlich von der Einwirkung einer radioaktiven Verbindung auf einen Mikroorganismus eine irgendwie geartete Veränderung der Eigenschaften des betroffenen Mikroorganismus erwartet werden muß. Wir vermuteten, daß die "Schwelle der Erkennbarkeit", d. h. mit anderen Worten die statistische Auswirkung einer solchen Veränderung, aktivitätsdosisabhängig sein würde. Es interessierte uns zu erfahren, ob sich etwa schon im Bereich von Aktivitätsdosen, wie sie bei Markierungs- und Stoffwechselversuchen angewandt worden sind, Veränderungen erfassen lassen würden, die auf die radioaktive Exposition der Mikroorganismen zurückgeführt werden müßten.

Aus der Fülle der Kombinationsmöglichkeiten: Radioaktivität - Mikroorganismus wählten wir den speziellen Fall der Einwirkung radioaktiven Phosphors auf Tuberkelbakterien.

In der Einleitung haben wir über die Markierungs- und Stoffwechseluntersuchungen mit P-32 an Mycobacterium tuberculosis berichtet, die uns aus der Literatur bekannt sind. Bei den Markierungsversuchen von Spiess und Poppe wurden Aktivitätskonzentrationen von 10 - 30 µc/ml, bei den Stoffwechseluntersuchungen von J. Meissner und Kropp Aktivitätskonzentrationen von 0,33 µc/ml Nährsubstrat verwendet. Wir legten den Aktivitätskonzentrationsbereich für unsere eigenen Untersuchungen auf Konzentrationsreihen von 10 bis 100 µc/ml Nährsubstrat fest.

Die bakteriellen "Eigenschaften", die wir in Bezug auf ihre etwaige Veränderung durch die Einwirkung der obengenannten Aktivitäten für prüfenswert hielten, waren: das Wachstum der Kulturen als allgemeines Zeichen der "Vitalität",
die Katalaseaktivität als Fermentreaktion,
die Chemosensibilität bzw. -resistenz gegen Streptomycin, p-Aminosalizylsäure, Conteben und Isoniazid als Eigenschaften, deren spontane Mutabilität bekannt ist.

Bei der Beschreibung der Versuche und Versuchsergebnisse (3, S. 34 bis 70) wird sich im übrigen zeigen, daß sich aus dem Ergebnis der Hauptversuche (Wachstum, Katalaseaktivität, Chemoresistenz bzw. -sensibilität von 8 TB-Stämmen vor und nach Exposition auf radioaktiven P-32-haltigen Nährböden) die weitere Frage ableiten ließ, ob zwischen den von uns im Rahmen der Hauptversuche beobachteten Phänomenen und der Phosphataufnahme, d. h. der Inkorporation des P-32, durch die TB ein Zusammenhang nachweisbar wäre. Wir suchten der Lösung dieser Frage mit Hilfe besonders entwickelter Versuchsanordnungen näher zu kommen.

22 Biologisches Material und biologische Methoden

221 Untersuchte Stämme

Untersucht wurden insgesamt 8 Stämme von Mycobacterium tuberculosis: Ein BCG-Stamm, der uns freundlicherweise vom Robert-Koch-Institut in Berlin N 65, Föhrer Straße 20, zur Verfügung gestellt wurde, der Standardstamm H 37 Rv aus dem Bestand des MUA III und sechs aus dem Sputum oder aus dem Magensaft von Patienten der Tuberkuloseabteilungen des Städtischen Augusta-Viktoria-Krankenhauses in Berlin-Schöneberg und des Städtischen Wenckebach-Krankenhauses in Berlin-Tempelhof isolierte Stämme, die im folgenden mit den Symbolen Ur, Hä, Ro, Hr, Ho und Bl bezeichnet werden.

Die Stämme wurden durch regelmäßige Kulturpassagen auf festen Nährböden (Eiernährböden, s. Grundnährboden, 2221) weitergezüchtet. In den Versuchen wurde in der Regel mit Abschwemmungen von 3 Wochen alten Reinkulturen gearbeitet.

Die genannten Stämme waren durch eine Reihe von Eigenschaften wie Wachstum auf glyzerinfreien und glyzerinhaltigen Nährböden, Verhalten im Tierversuch und im Katalaseversuch und Empfindlichkeit oder Resistenz gegen Streptomycin (Sm), Para-Aminosalizylsäure (PAS), Conteben (Cont) und Isonikotinsäurehydrazid (INH) charakterisiert. Die Untersuchungen zur Feststellung dieser Eigenschaften wurden an den Reinkulturen der isolierten Stämme durchgeführt, ehe eine Exposition auf radioaktiven Nährböden stattgefunden hatte. Tab. 221-1 gibt eine Übersicht über das Ausgangsmaterial.

Übersicht über die verwendeten TB-Stämme

Tab. 221-1

Stamm		H 37	BCG	Ur	Hä	Ro	Hr	Ho	Bl
Wachstum mit Glyzerin		++++	+++	++++	+++	++++	++++	++++	++++
ohne Glyzerin		++	+	++	+	++	+	+	++
Tierversuch [1] (Meerschweinchen)		pos./1	pos./(g)	pos./1	pos./(g)	pos./1	pos./1	pos./(g)	pos./(g)
Katalase [2]		positiv	positiv	positiv	positiv	negativ	negativ	pos./neg.	negativ
Hemmwert [3] in γ/ml für	Sm	1-5	5	5	1-5	50(i)/1	50	50(i)/1	50(i)/10
	PAS	1	5	1	1	50	50	1	1
	Cont	1	1	1	1	1	1	1	1
	INH	0,1	0,1	0,1	0,1	50(i)/5	50	50(i)/0,05	50

1) Die Buchstaben geben den Grad der Infektionsausbreitung nach Opitz an (s. unter 225):
1 = "fast lokalisierte Tuberkulose" = Primärkomplex mit Drüsenbeteiligung bis zur Ileocoecalgruppe

1 = "vorwiegend lokalisierte Tuberkulose" = Primärkomplex mit Drüsenbeteiligung bis zur Ileocoecalgruppe und einzelne Herdchen in der nicht vergrößerten Milz

(g)= "beschränkt generalisierte Tuberkulose" = stärkere Beteiligung der Milz und vereinzelte Knötchen in der Lunge

2) Bei Stamm Ho fiel der Katalase-Versuch wechselnd positiv und negativ aus. Das Ergebnis korrespondiert mit der "Inkonstanz" des Stammwertes für INH (s. unter 226 u. Tab. 361-1 und 361-2)

3) Sm = Streptomycin. PAS = p-Aminosalicylsäure. Cont = Conteben. INH = Isonikotinsäurehydrazid. Der Buchstabe "(i)" hinter dem Hemmwert heißt, daß dieser Wert "inkonstant" war, d.h. sich im Laufe der Beobachtung bei wiederholten Kontrollen spotan änderte (s. unter 361).

222 Nährböden - Zusammensetzung und Herstellung

2221 Grundnährboden

Als Grundnährboden wurde Hohn-Substrat 4 mit Glyzerin nach den Angaben des Arbeitsausschusses für Chemotherapie im Deutschen Zentralkomitee zur Bekämpfung der Tuberkulose (DZK) verwendet, in einer Menge von 5 ml pro Testgefäß. Der Nährboden setzt sich folgendermaßen zusammen:

A Kartoffelemulsion mit modifizierter Lockemann-Lösung und Glyzerin

B Einährboden (Substrat 4) mit Sautonlösung.

Die Herstellung erfolgt nach folgendem Rezept:

A. Herstellung der Kartoffel-Emulsion:

1. In 1-Liter-Kolben kommen
   450 ccm Aqua dest.
   20 gr. Kartoffelmehl
   3 eigroße, feingeschnittene Kartoffeln

   Der Wasserstand wird am Kolben markiert. Der Kolben wird zuerst 10 min lang unter ständigem Rühren mit einem Holzlöffel im kochenden Wasserbad gehalten, dann 1 Std. lang unter zeitweiligem Umrühren weitergekocht.

2. Das verkochte Wasser wird bis zur Marke aufgefüllt.

3. Die Kartoffelmasse mit vielen kleinen weichen Stückchen wird durch ein feines Durchschlagsieb mit einem Pistill in einen großen Mörser gedrückt und diese Prozedur wiederholt.

4. 450 ccm der dickflüssigen Masse werden abgemessen und in einen 1-Liter-Kolben gefüllt.

5. Zusatz von 50 ccm einer etwas modifizierten Lockemannlösung (Zusammensetzung und Herstellung s. unten)

6. Zugabe von 80 ccm Glyzerin bidest.

7. Abkühlen auf 50^{0}.

8. Abfüllen zu 50 ccm mit einer Bauchpipette in 500-ccm-Kölbchen.

9. Sterilisieren der Kölbchen 3 mal 1 Std. lang bei 100^{0} an 3 aufeinanderfolgenden Tagen.

10. Aufheben der Kölbchen im Kälteschrank.

    Auf diese Weise erhält man 11 Kölbchen Grundgemisch. Es werden 500-ccm-Kölbchen verwendet, weil sich darin die Herstellung des Substrates 4 später bequem durchführen läßt.

Zusammensetzung und Herstellung der modifizierten Lockemann-Lösung:

In 45 ccm heißem Aqua dest. werden genau in der angegebenen Reihenfolge gelöst (die nachfolgende Substanz wird zugegeben, wenn die vorhergehende völlig gelöst ist):

1. Asparagin ($C_4H_8O_3N_2 + H_2O$) = 3,0 g
2. Alanin ($C_3H_7O_2N$) = 2,0 g
3. Mononatriumphosphat ($NaH_2PO_4 + 2\ H_2O$) = 1,5 g
4. Monokaliumphosphat (KH_2PO_4) = 2,0 g
5. Natriumzitrat ($Na_3C_6H_5O_7 + 5\ 1/2\ H_2O$) = 1,25 g
6. Magnesiumsulfat ($MgSO_4 + 7\ H_2O$) = 1,25 g

   (in 5 ccm Aqua dest. werden 1,25 g $MgSO_4$ über der Flamme gelöst und dann der übrigen Flüssigkeit zugesetzt)
7. Ferriammonsulfat ($FeNH_4\ (SO_4)\ 2 + 12\ H_2O$) = 5mg

   (250 mg werden in 5 ccm Aqua dest. unter Kochen gelöst und davon 0,1 ccm mit der Pipette zugesetzt. Die Lösung trübt sich leicht, klärt sich aber nach kurzem Aufkochen völlig)

B. Herstellung des Einährbodens (Substrat 4) mit Sautonlösung:

1. Ein Kölbchen mit verkleistertem Grundsubstrat wird kräftig geschüttelt und dann in kochendes Wasser gestellt, wo es nach 10 min unter weiterem Schütteln wieder verflüssigt wird (Abkühlen auf 50^{o}).
2. Unterdessen wird der Inhalt von 2 ganzen Eiern und 4 Eidottern nach der üblichen Reinigung der Schalen mit Alkohol in ein steriles Pulverglas (300 ccm Inhalt) mit Glasperlen entleert und geschüttelt.
3. Die Eimenge (180 bis 185 ccm) wird der flüssigen, abgekühlten Kartoffelemulsion in dem 500-ccm-Kölbchen zugesetzt. Zur Vermeidung von koaguliertem Schaum in dem unteren Teil des Röhrchens und zur Zurückhaltung von festeren Partikeln aus dem Hühnerei läßt man die gesamte Eimenge durch ein ausgeglühtes feines Drahtsieb über einen sterilen Trichter oder durch ein über einen sterilen Trichter gespanntes, steriles Stückchen Mull zur Kartoffelemulsion zulaufen.
4. Zusatz von 5 ccm einer 0,75%igen Malachitgrünlösung (Standard Leverkusen). Gut durchmischen.

5. Zusatz von Sautonlösung (Zusammensetzung und Herstellung s. untern), und zwar 2/3 Kartoffeleimenge, 1/3 Sautonlöung. -
Der Malachitgrüngehalt beträgt jetzt 1 : 10 000.

6. Je 5 ccm in Röhrchen pipettieren. Korkverschluß der Röhrchen.

7. Koagulieren einmal 1 Std. bei 80 bis 83° im Koagulierschrank mit Wassermantel. Die Höchsttemperatur von 83° darf nicht überschritten werden.

Zusammensetzung und Herstellung der Sautonlösung:

Asparagin	4,0 g
Zitronensäure	2,0 g
K_2HPO_4	0,5 g
Magnesiumsulfat	0,5 g
Ferriammonzitrat	0,05 g
Glyzerin	60,0 g
Aqua dest. ad	1000,0 g

Mit NH_4OH einstellen auf pH = 7,2.

Gemäß den Empfehlungen des DZK im "Vorläufigen Merkblatt über die Resistenz von Tuberkelbakterien gegenüber Conteben, PAS und Streptomycin" vom 17. 9. 1951 wird dieser Nährboden im MUA III für die Resistenzbestimmungen der TB im Reinkulturverfahren routinemäßig gebraucht und hat sich dabei sehr gut bewährt. Auch in unseren Versuchen war ein gleichmäßiges, kräftiges Oberflächenwachstum der Kolonien bei den Kontrollen auf diesem Nährboden zu beobachten. Im Vergleich dazu ließ sich das Wachstum in den Versuchsröhrchen verhältnismäßig gut abschätzen. Auch bei relativ spärlichem Wachstum war die Entnahme von kolonienhaltiger Kulturmasse mit der Öse zur Weiterverarbeitung gut durchführbar.

2222 Chemotherapeutikahaltige Nährböden

Die chemotherapeutikahaltigen Nährböden für die Resistenzbestimmungen gegen Sm, PAS, Cont und INH wurden nach den Angaben des "Vorläufigen Merkblattes" vom 17. 9. 51 und des "Merkblattes" vom 14. 5. 53 des Arbeitsausschusses für Chemotherapie im DZK zubereitet. Auch hierbei betrug die Nährbodenmenge je Röhrchen 5 ml.

2223 Radioaktive Nährböden

In Vorversuchen wurde geklärt, daß 4 ml Grundnährboden + 1 ml Aqua dest., im Reagenzglas kräftig durchgeschüttelt, bei 80° gleichmäßig mit glatter Oberfläche erstarren, und daß es nach Beimpfung dieser Nährböden zu einem kräftigen Oberflächenwachstum der Kolonien kommt, wobei der entstehende Bakterienrasen keine wesentlich größere Feuchtigkeit erkennen läßt als die Kontrollen auf 5 ml Grundnährboden.

Daraufhin wurden die radioaktiven Nährböden in der Weise hergestellt, daß im Reagenzglas bzw. in der Petrischale (s. 2272) jeweils 4 ml des noch flüssigen Grundnährbodens mit steigenden Mengen einer auf eine Aktivität von 500 µc/ml eingestellten sterilen $Na_2HP^{32}O_4$-Lösung (s. 231) versetzt und in Form einer Verdünnungsreihe mit sterilem Aqua dest. auf insgesamt 5 ml aufgefüllt wurden. Anschließend wurden die Ansätze nach gleichmäßigem Schütteln von Hand (mit dem Ferngreifer) wie üblich zum Koagulieren gebracht. Bei dieser Art des Vorgehens war die unter den erschwerenden Bedingungen des Strahlenschutzes (s. 233) durchzuführende Arbeit uaf ein Minimum beschränkt, nämlich auf das Zufügen abgemessener Mengen von $Na_2HP^{32}O_4$ - Lösung und das Durchmischen der einzelnen Ansätze.

Nach der Koagulation wurde die Aktivität jedes einzelnen Kulturgefäßes gemessen (s. unter Meßtechnik, 232). Dadurch wurde einerseits die Genauigkeit der angesetzten Konzentrationsreihe kontrolliert, andererseits die Ausgangsaktivität in Imp/min festgelegt, was ohne Umrechnung auf Curie-Werte jederzeit einen Vergleich mit allen anderen innerhalb der jeweiligen Versuchsreihe mit der gleichen Technik gemessenen Aktivitätswerten ermöglichte. In den folgenden Tabellen 2223-1 bis 2223-4, die eine Übersicht über die Zusammensetzung der in den einzelnen Versuchsreihen verwendeten radioaktiven Nährböden geben, sind in der letzten Spalte die Verhältniszahlen der aus den Messungen errechneten Impulszahlen-Mittelwerte eingetragen. In der vorletzten Spalte stehen zum Vergleich die für die einzelnen Verdünnungsreihen aus dem Ansatz errechneten Verhältniszahlen, bezogen auf die niedrigste gewählte AK von 10 µc/ml = 1. Im ganzen handelt es sich um die in den Versuchsreihen 311 bis 314 verwendeten Nährböden, die zum Teil in der üblichen Weise in Reagenzgläsern, zum Teil in kleinen Petrischalen angesetzt wurden (s. unter 2271 u. 77272 sowie unter 311 bis 314).

Tab. 2223-1 Versuchsreihe 311, 6.9.56 Reagenzgläser

Grundnährboden	A. dest. steril.	$Na_2HP^{32}O_4$ Lösung 500 µc/ml	Gesamtaktivität	AK	Verhältniszahlen der AK d. Nährböden errechnet aus dem Ansatz	aus gem. Imp/min
ml	ml	ml	µc	µc/ml		
5	-	-	-	-	0	-
4	1,0	-	-	-	1	-
4	0,9	0,1	50	10	1	-
4	0,8	0,2	100	20	2	-
4	0,7	0,3	150	30	3	-
4	0,6	0,4	200	40	4	-
4	0,5	0,5	250	50	5	-
4	0,4	0,6	300	60	6	-
4	0,3	0,7	350	70	7	-

Tab. 2223-2 Versuchsreihe 312, 8.11.56 Reagenzgläser

5	-	-	-	-	0	0
4	1,0	-	-	-	0	0
4	0,6	0,4	200	40	4	4
4	0,5	0,5	250	50	5	4,92
4	0,4	0,6	300	60	6	6,11
4	0,3	0,7	350	70	7	7,19
4	0,2	0,8	400	80	8	8,0

Tab. 2223-3 Versuchsreihe 313, 8.11.56 Petrischalen

5	-	-	-	-	0	0
4	1,0	-	-	-	0	0
4	0,9	0,1	50	10	1	1
4	0,8	0,2	100	20	2	2,04
4	0,7	0,3	150	30	3	3,04
4	0,6	0,4	200	40	4	4,01
4	0,5	0,5	250	50	5	5,07
4	0,4	0,6	300	60	6	6,2
4	0,3	0,7	350	70	7	7,25
4	0,2	0,8	400	80	8	8,7

Tab. 2223-4 Versuchsreihe 314, 31.1.57 Reagenzgläser

5	-	-	-	-	0	0
4	1,0	-	-	-	0	0
4	0,8	0,2	100	20	2	2
4	0,6	0,4	200	40	4	3,98
4	0,4	0,6	300	60	6	5,68
4	0,2	0,8	400	80	8	7,71
4	-	1,0	500	100	10	9,63

223 Beimpfung der Nährböden

Zur Beimpfung wurden Aufschwemmungen von 2 Ösen (4 mm Ø) der Reinkulturmasse in ca. 4 bis 5 ml physiol. NaCl-Lösung verwendet. Die Dichte der durch Schütteln mit Glasperlen hergestellten Suspension wurde durch Trübungsvergleich mit einer Bariumsulfatlösung eingestellt, deren optische Dichte einem Gehalt von 2 mg Bakt. feuchtgew. / ml entsprach. Jeweils 1 Tr. der Suspension kam zur Einsaat (Pasteur-Pipette).

224 Resistenzbestimmungen

Die Empfindlichkeit bzw. Resistenz der in Tab. 211 aufgeführten TB-Stämme gegen Sm, PAS, Cont und INH wurde nach der im MUA III gemäß den Empfehlungen des Ausschusses für Chemotherapie im DZK gebräuchlichen Standardmethode im Reinkulturverfahren auf Hohn-Substrat 4/Gottsacker geprüft. Folgende Konzentrationen wurden getestet:

Tab. 224-1

Verdünnung 1:	Konzentration γ/ml Nährb. (Hemmwert)	Chemotherapeutikum			
$2 \cdot 10^4$	50	Sm	PAS	Cont	INH
$1 \cdot 10^5$	10	Sm	PAS	Cont	INH
$2 \cdot 10^5$	5	Sm	PAS	Cont	INH
$1 \cdot 10^6$	1	Sm	PAS	Cont	INH
$1 \cdot 10^7$	0,1	-	-	-	INH
$2 \cdot 10^7$	0,05	-	-	-	INH

Das Ablesen der Teströhrchen erfolgte 21 Tage nach der Beimpfung. Dabei wurde das ebenfalls vom DZK angegebene Schema verwendet:

Tab. 224-2

Symbol	Befund
++++	Dichter Rasen
+++ ++	Aufgelockerter Rasen, je nach Dichte
+	Einzelkolonien - über 50 Kol.
(+)	Einzelkolonien - unter 50 Kol.
0	Kein Wachstum

Dasselbe Ableseschema wurde außer bei den Resistenzbestimmungen in sämtlichen Versuchen angewandt, wenn es sich um die Definition der Größe "Wachstum" handelte.

Als Kontrollstamm diente bei den Resistenzbestimmungen der voll empfindliche Standardstamm H 37 Rv aus dem MUA III. Die Empfindlichkeit oder Resistenz eines Stammes wird im allgemeinen durch den Hemmwert in γ/ml ausgedrückt - das ist diejenige Konzentration des Chemotherapeutikums, bei der kein Wachstum mehr erfolgt ist oder nur noch einzelne Kolonien gewachsen sind, deren Zahl in () angegeben ist.

225 Tierversuch

Die Tierversuche wurden an tuberkulinnegativen Meerschweinchen mit einem Durchschnittsgewicht von 200 g durchgeführt. 1 ml der 1 : 10 verdünnten TB-Suspension (Herstellung s. 223, S. 26), also ca. 0,2 mg Bakterienfeuchtgewicht, wurden subkutan in die Schenkelbeuge injiziert. 19 Tage später war bei allen Tieren eine Schwellung der inguinalen Lymphknoten festzustellen. Die Tiere wurden 28 Tage nach der Infektion getötet und seziert. Die Sektionsergebnisse sind nach Opitz in folgende sechs Grade eingeteilt, die in Tab. 222-1 in der Spalte "Tierversuch" bei den positiven Ergebnissen eingetragen sind:

a) "streng lokalisierte Tuberkulose" = 1
(= isolierter Primärkomplex)

b) "fast lokalisierte Tuberkulose" = 1
(= Primärkomplex mit Drüsenbeteiligung bis zur Ileocoecalgruppe)

c) "vorwiegend lokalisierte Tuberkulose" = 1
(= Veränderungen wie bei b) und einzelne Herdchen in der nicht vergrößerten Milz)

d) "beschränkt generalisierte Tuberkulose" = (g)
(= stärkere Beteiligung der Milz und vereinzelte Knötchen in der Lunge)

e) "generalisierte Tuberkulose" = g
(= Metastasen in allen Organen)

f) "schwere generalisierte Tuberkulose" = g
(= besonders stark ausgeprägte Veränderungen wie bei e)

226 Katalase-Versuch

Zum Nachweis der von den TB produzierten Katalase wurde die Reaktion in der von G. Middlebrook angegebenen Form durchge-

führt: Die auf der Nährbodenoberfläche gewachsenen, 3 bis 4 Wochen alten Kolonien wurden bei einer Temperatur von 20° mit einer Lösung von gleichen Teilen 30%igem H_2O_2 (Perhydrol Merck) und 10%igem Tween 80 in dest. Wasser bedeckt. Bei positiver Reaktion entwickeln sich innerhalb längstens 1 min makroskopisch gut erkennbare Gasblasen von O_2 über den submersen Kolonien.

227 Testgefäße

2271 Reagenzgläser

Im allgemeinen wurden je 5 ml des Nährsubstrates in Reagenzgläser abgefüllt und in Schräglage zum Koagulieren gebracht, so daß sich nach der Erstarrung eine große Oberfläche ergab. In dieser üblichen Weise wurde bei allen Resistenzbestimmungen und bei dem größten Teil der Versuche mit radioaktiven Nährböden verfahren. Auch die Weiterzüchtung der Ausgangsstämme erfolgte durch regelmäßige Überimpfung in Schrägröhrchen.

2272 Petrischalen

In einigen Versuchsreihen wurde das noch flüssige Nährsubstrat in 5-ml-Portionen in kleine Petrischalen mit einem Durchmesser von 5 cm ausgegossen. Durch ringförmigen Verschluß mit Plastilin nach der Beimpfung konnte ein Austrocknen des wie üblich koagulierten und dann ca. 4 bis 5 mm Schichthöhe aufweisenden Nährbodens verhindert werden. S. Abb. 2272-1

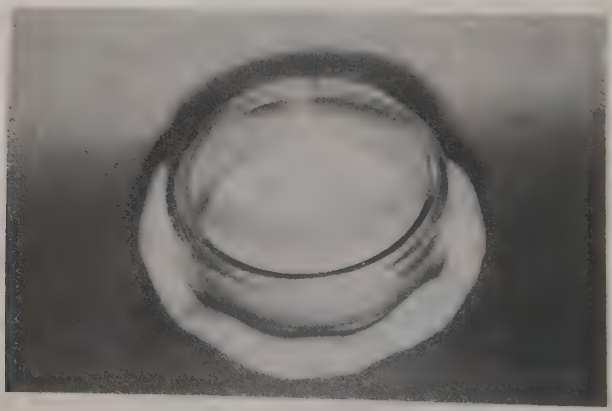


Abb. 2272-1

Petrischale mit erstarrter Nährbodenschicht und ringförmigem Plastilinverschluß. Kondenswasser an der Innenseite des Deckels.

Kontrollen zeigten ein ebenso kräftiges Wachstum der Kolonien in diesen Petrischälchen wie in den mit Korken verschlossenen Reagenzgläsern. Auf die in den Petrischalen bei manchen Versuchsreihen verwendeten Membranfilterauflagen auf der Nährbodenschicht (Spezial-Membranfilter Co 5 der Membranfilter-Gesellschaft Sartorius-Werke AG & Co, Göttingen) wird bei der Beschreibung der entsprechenden Versuche näher eingegangen. Als Hinweis soll an dieser Stelle nur die Abbildung der mit einem Membranfilter belegten Nährbodenschicht in der Petrischale wiedergegeben sein:

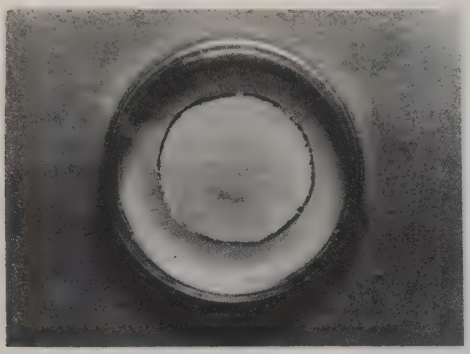


Abb. 2272-2

Petrischale mit erstarrter Nährbodenschicht und Membranfilterauflage. Rand der Membranfilterauflage mit einem Kohlestrich markiert.

2273 Doppelröhrchen

Zur Beantwortung einer besonderen Fragestellung wurden Spezial-Reagenzgläser verwendet, die die Fa. Theodor Karow in Berlin-Steglitz nach Entwurf hergestellt hat. Das Prinzip war, die radioaktive Phosphorlösung in diesen Gläsern nicht mit dem Nährsubstrat zu vermischen, wohl aber die Oberflächenkulturen einer ionisierenden Bestrahlung etwa vergleichbarer Intensität auszusetzen. Zu diesem Zweck wurde in einem normalen Reagenzglas von 15 mm lichter Weite ein etwa 20 mm kürzeres, dünnwandiges, ca. 8 mm lichte Weite messendes Reagenzglas mit zwei Füßchen am Boden angeschmolzen. Die Längsachse des kleineren Glases war dabei exzentrisch, aber parallel zu der des größeren Glases angeordnet. Innen- und Außenröhrchen waren mit einem Korken für sich zu verschließen, der Korken des Innenröhrchens wurde mit Hilfe einer sterilen Pinzette aufgesetzt.

Die Einfüllung des Nährsubstrates in das größere der beiden Gläser ging bei verschlossenem und leerem Innenröhrchen vor sich, anschließend erfolgte die Koagulation in der üblichen Schräglage, wobei sich das Substrat gleichmäßig um das Innenröhrchen verteilte und dieses nach der Erstarrung umschloß. Danach wurde die radioaktive Phosphorlösung in das Innenröhrchen eingefüllt. Anschließend wurde der Nährboden (bei wieder verschlossenem Innenröhrchen) in der oben beschriebenen Weise beimpft. Abb. 2273-1 zeigt das Doppelröhrchen nach Einfüllung und Erstattung des Nährsubstrates und nach Einfüllung der Lösung in das Innenröhrchen.

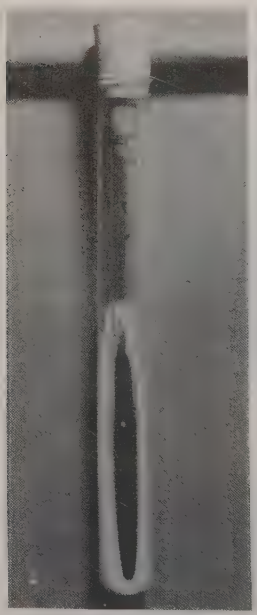


Abb. 2273-1

Doppelröhrchen. Im äußeren Reagenzglas befindet sich der erstarrte Nährboden, der das Innenröhrchen mantelförmig umschließt, wobei nur die oberflächliche Seite des Innenröhrchens in der Schräglage frei bleibt.

Das Innenröhrchen ist zur besseren Erkennbarkeit mit schwarzer Tinte gefüllt. Flüssigkeitsspiegel und Zunge des koagulierten Nährbodens befinden sich bei Schräglage in der gleichen Höhe.

Wir waren uns darüber klar, daß das Spektrum der im Doppelröhrchen auf die TB einwirkenden Strahlen durch die ß-Strahlenabsorption in der Glaswand des Innenröhrchens ein anderes war als in den Versuchen, bei denen die radioaktive Phosphorlösung direkt mit dem Nährboden vermischt wurde, und daß sich die ß-Strahlenabsorption auch auf die Dosis auswirkte. Einen gewissen Ausgleich suchten wir durch eine höhere Konzentration der P-32-Lösung herbeizuführen (s. unter 315). Im übrigen war aber bei der Anordnung der Doppelröhrchenversuche sowohl theoretisch als auch durch unsere Impulszahlenmessungen am fertigen Präparat das für unsere Fragestellung entscheidende Prinzip gesichert, daß die TB-Kolonien auf dem inaktiven Nährboden im "Außenröhrchen" einer von der P-32-Lösung im "Innnenröhrchen"

einer von der P-32-Lösung im "Innenröhrchen" ausgehenden ionisierenden Strahlung ausgesetzt waren, ohne P-32 inkorporieren zu können.

228 Mikroskopische Präparate

Mikroskopische Präparate wurden zur Kontrolle der Kulturen in üblicher Weise als Ausstrichpräparate hergestellt und nach Ziehl-Neelsen gefärbt.

23 Physikalisches Material und physikalische Methoden

231 Radioaktiver Phosphor - P-32

P-32 wurde in Form einer sterilen $Na_2HP^{32}O_4$-Lösung von der Fa. Bayer/Leverkusen geliefert. Der jeweils gewünschte Aktivitätsgehalt der Lösung war von der Firma unter Einberechnung des physikalischen Zerfalls auf eine bestimmte Stunde des Auslieferungstages eingestellt. Vor Ansetzen der Verdünnungsreihe (s. 2123) wurde die gelieferte Lösung so weit verdünnt, daß in 1 ml Lösung 500 µc Aktivität enthalten waren.

232 Meßtechnik

Die Aktivitätsmessungen wurden z. T. mit einem Geiger-Müller-Zählrohr, z. T. mit einem Szintillationszähler durchgeführt, die beide an dasselbe Meßgerät angeschlossen waren (Universalmeßplatz der Fa. Philipps NV Eindhoven, Routinegerät für medizinische Isotopenanwendung).

Die Verwendung zweier verschiedener Zählrohrtypen war aus Gründen der Meßgeometrie gegeben. In dem z. Zt. unserer Versuche noch nicht vollständig ausgerüsteten Isotopenlabor stand uns ein Szintillationszählrohr mit Bohrlochkristall, wie er für die Aktivitätsmessung der Reagenzglasproben ideal gewesen wäre, nicht zur Verfügung. Wegen der im bakteriologischen Labor auf Reagenzgläser abgestimmten Einrichtung und Arbeitsweise war es nicht möglich, bei allen Versuchen grundsätzlich eine andere Form von Testgefäßen, z. B. Petrischalen wie bei unseren Membranfilterversuchen (s. unter 2272), zu benutzen. Da sich die typische Reagenzglas-Schrägkultur durch eine große Oberfläche bei unterschiedlicher Schichtdicke auszeichnet, und da es sich außerdem z. T. um relativ geringe Aktivitäten handelte, war uns daran gelegen, bei der Messung der Impulsraten das Präparat im ganzen zu erfassen. Das war mit Hilfe des vorhandenen Rundtubus des Szintillationszählrohres nicht möglich. Dagegen erwies sich die 10 cm lange, schmale Blendenöffnung unseres Geiger-Müller-Zählrohrs (für Summationszählungen über der Schilddrüse beim Radio- Jod-Test gedacht) als geeignet. Das Teströhrchen wurde in einer besonderen, muldenförmigen Halterung direkt vor das Zählrohrfenster gebracht.

Mit dieser Meßmimik konnten wir nun aber bei den Petrischalenpräparaten mit runder, gleichmäßig dicker Nährbodenschicht von 5 cm Ø nicht weiterkommen. Hierfür war die runde Fensterung unseres Szintillationszählrohres mit Rundtubus, auf dessen Aluminiumdeckel die Petrischale direkt aufgesetzt werden konnte, sehr viel günstiger.

Unabhängig vom System wurden bei jeder Messung bei den geringeren Aktivitäten 10^4 (in Ausnahmefällen 10^3), bei den höheren Aktivitäten 10^5 Impulse gezählt, die vom Gerät gestoppte Zeit abgelesen und der Wert auf Impulse pro Minute = Imp/min umgerechnet. Der jeweils

am Morgen des Untersuchungstages auf die gleiche Weise ermittelte O-Effekt wurde abgezogen.

Die erhaltenen Impulsraten bewegten sich im Geiger-Müller-System, also bei den Reagenzglasproben, zwischen 500 und 5000 Imp/min bei einem O-Wert um 60 Imp/min. Beim Szintillationszählrohr, d.h. bei den Petrischalen, lagen die entsprechenden Zahlen zwischen 400 und 48 000 Imp/min mit O-Effekten um 200 Imp/min.

Selbstverständlich wurden bei der Auswertung der Versuche die mit den beiden verschiedenen Zählrohrsystemen ermittelten Impulsraten in keinem Falle direkt miteinander in Beziehung gesetzt, sondern nur die mit demselben System gemessenen Impulszahlen miteinander verglichen.

233 Strahlenschutz

Alle Versuche, bei denen mit dem radioaktiven Phosphorpräparat gearbeitet wurde, wurden in dem zur Zeit der Versuche noch provisorischen Isotopenlabor der Strahlenabteilung des Städtischen Auguste-Viktoria-Krankenhauses in Berlin-Schöneberg durchgeführt.

Zur Abschirmung der β-Strahlung war der Arbeitstisch nach unten wie nach vorne durch 10 mm starke Bleiglasscheiben gesichert. Zur Abfüllung wurden Fernpipetten und Fernbüretten benutzt, wie sie für die Arbeiten mit geringeren Aktivitäten verwendet werden. Außerhalb des Brutschrankes, der mit einem ca. 30 mm dicken Wassermantel umgeben war, war mit dem Labor-Taschendosimeter FH 40 H der Fa. Friesecke und Hoepfner, Erlangen-Bruck, keinerlei Strahlung mehr nachzuweisen.

3 Beschreibung der Versuche und Versuchsergebnisse

31 TB-Wachstum auf P-32-haltigen festen Nährböden

Aus der uns zur Verfügung stehenden Literatur (1, S.11/12) war zu entnehmen, daß TB bei Exposition auf P-32-haltigen Nährböden bis zu einer AK von 30 µc/ml keine Beeinträchtigung der Vitalität und des Stoffwechsels, also auch keine Wachstumshemmung erkennen liessen. Daraus ergab sich die Fragestellung:
Wo liegt die "Schwelle der Erkennbarkeit" (1, S.10) für die Wachstumshemmung der TB bei Exposition auf P-32-haltigen Nährböden?

311 H 37 und Ro auf P-32-haltigem Nährboden in Reagenzgläsern

Der Standardstamm H 37 und der Patientenstamm Ro (Tab. 221-1) wurden auf P-32-haltige, halbsynthetische, feste Nährböden mit einer AK von 10 - 70 µc/ml gebracht. Die Zusammensetzung der radioaktiven Nährböden geht aus Tab. 2223-1 hervor. Parallel wurden Grundnährböden (2221) mit Zusatz einer den radioaktiven Nährböden äquivalenten Verdünnungsreihe inaktiver Na_2HPO_4-Lösung beimpft. Für jede Konzentrationsstufe der aktiven und der inaktiven Reihe wurden je zwei Proben angesetzt. Als Kontrollen dienten jeweils ein Ansatz mit 5 ml Grundnährboden und ein Ansatz mit 4 ml Grundnährboden + 1 ml Aqua dest. Die Bebrütung erfolgte in der üblichen Weise bei 37°. Nach 11 Tagen war bei den Kontrollen ein kräftiges Wachstum festzustellen, es wurde daher zu diesem Termin das Wachstum der Kolonien nach dem in Tab. 224-2 angegebenen Schema abgelesen. Das Ergebnis war folgendes:

Bei durchschnittlich dicker Rasenbildung der Kulturen beider Stämme in den Kontrollröhrchen und in dem inaktiven Na_2HPO_4-Medium zeigte Ro nach 11tägiger Exposition auf den radioaktiven Nährböden ein deutlich vermindertes Wachstum bei 50 bis 70 µc/ml. Eine vollständige Wachstumshemmung wurde nicht erreicht. Bei H 37 fand sich auf den P-32-haltigen Nährböden ein bis zur maximalen AK von 70 µc/ml nicht signifikant gehemmtes Wachstum.

Dieses Ergebnis ist in Abb. 311-1 dargestellt.

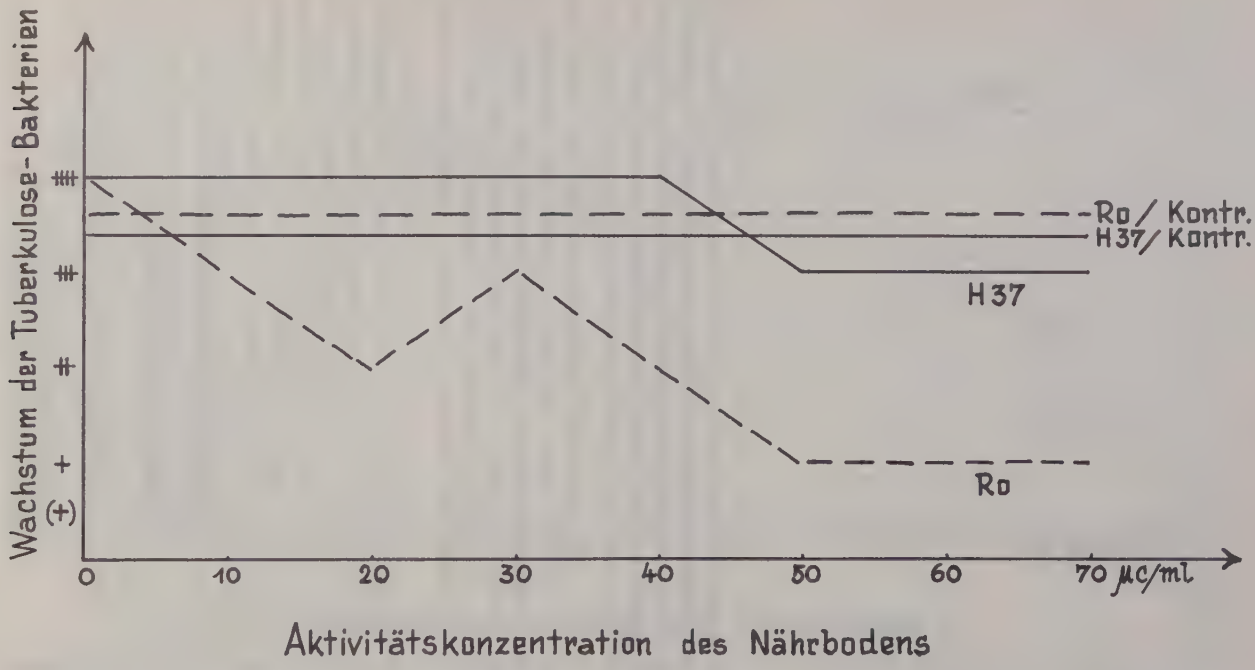


Abb. 311-1

Wachstum von H 37 und Ro auf P-32-haltigen Nährböden in Abhängigkeit von der Aktivitätskonzentration. Schrägröhrchen. (Die Kurven H 37/K und Ro/K zeigen das Wachstum der Kontrollen auf inaktiven Nährböden mit aquivalten Mengen von inaktiver Phosphorlösung; sie stellen eine Resultierende der dosisunabhängig zwischen ++++ und +++ schwankenden Ablesewerte dar.)

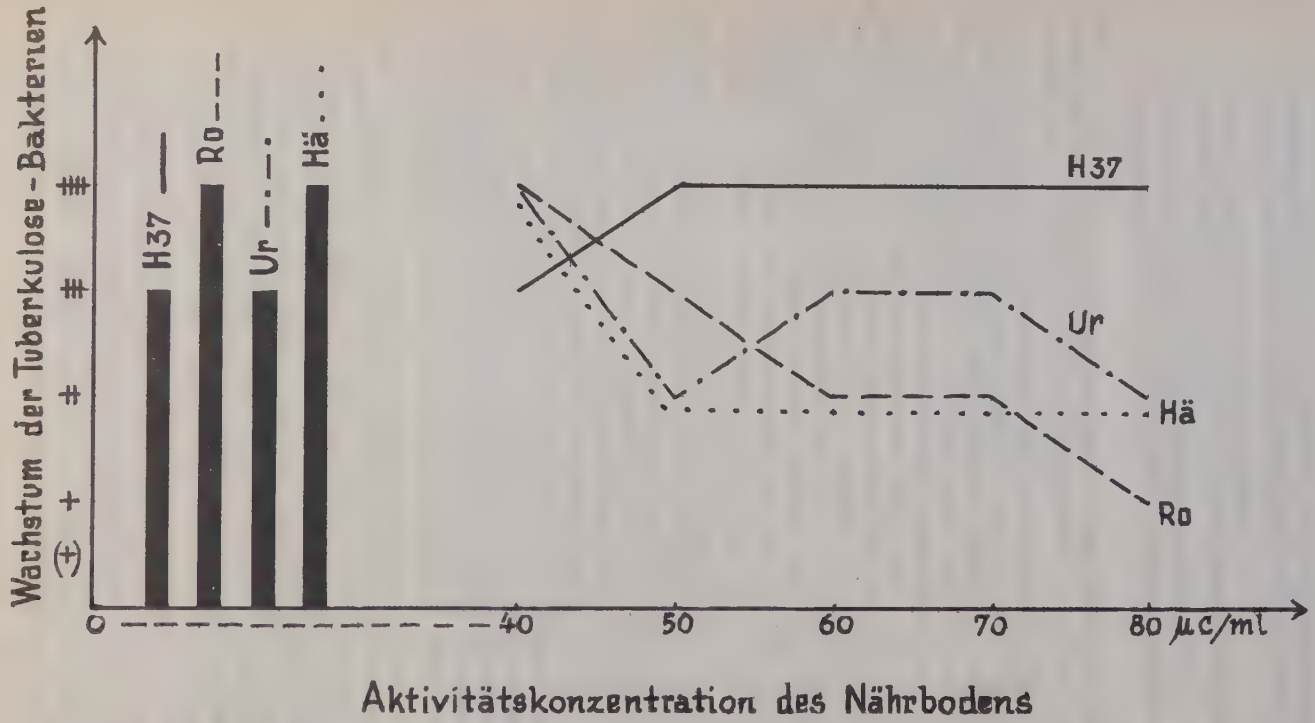
312 H 37, Ro, Ur und Hä
auf P-32-haltigem Nährboden in Reagenzgläsern

Nach dem im ersten Augenblick überraschenden Ergebnis eines unterschiedlichen Verhaltens zweier willkürlich herausgegriffener TB-Stämme auf radioaktiven Nährböden in einem quantitativ orientierend gedachten Versuch sollte eine neue Versuchsreihe zunächst nur der Kontrolle dienen und zugleich die Versuchsbasis etwas erweitern. In dieser Absicht wurden daher außer den beiden TB-Stämmen H 37 und Ro zwei weitere Patientenstämme Ur und Hä getestet, deren Eigenschaften aus Tab. 221-1 hervorgehen. Außerdem wurde die maximale AK der Versuchsreihe auf 80 µc/ml gesteigert (s. Tab. 2223-2). Die Abschwemmungen zur Beimpfung der Röhrchen wurden aus Reinkulturpassagen der Stämme hergestellt. Proben und Kontrollen wurden doppelt angesetzt. Eine radioaktive Exposition der Kulturen hatte noch nicht stattgefunden. Die Ablesung der TB-Wachstums erfolgte diesmal nach 20 Tagen Bebrütung.

Wie im vorangegangenen Versuch fand sich ein ungestörtes üppiges Wachstum von H 37 sowohl bei den Kontrollen als auch in Gegenwart von P-32 bis zur maximalen AK von 80 µc/ml. Ebenso ließ sich bei Ro wieder eine Wachstumshemmung auf den radioaktiven Nährböden feststellen, sie setzte bei einer AK von 60 µc/ml ein. Auch diesmal wurde eine komplette Hemmung nicht erreicht.

Von den beiden erstmals untersuchten Stämmen Ur und Hä zeigte Hä eine bei 50 µc/ml beginnende und bis 80 µc/ml gleichbleibende Wachstumshemmung, während Ur zwar im ganzen ungleichmäßig wuchs, aber im Vergleich zu den Kontrollen keine eindeutige Wachstumshemmung in Abhängigkeit von der AK des Nährbodens erkennen ließ. S. Abb. 312-1.

Abb. 312-1



Wachstum von H 37 ———, Ro - - - - -, Ur - . - und Hä . . . . . auf P-32-haltigen Nährböden in Abhängigkeit von der Aktivitätskonzentration des Nährbodens. Schrägröhrchen.
(Die Säulen geben das Wachstum der Kontrollen an.)

313 H 37, Ro, Ur und Hä
auf P-32-haltigen Nährböden in Petrischalen
ohne und mit Membranfilter-Auflage

Der eben beschriebene Kontrollversuch hatte gezeigt, daß das Ergebnis einer unterschiedlichen Wachstumshemmung von TB-Stämmen auf P-32-haltigen Nährböden reproduzierbar war. Nicht nur hatten die beiden ersten von uns untersuchten Stämme in Bezug auf die Fragestellung offenbar zwei verschiedenen Reaktionsgruppen angehört - auch die beiden neu hinzugekommenen TB-Stämme ließen sich hinsichtlich ihrer Wachstumsstärke auf den P-32-haltigen Nährböden differenzieren, wenn auch nicht so eindeutig wie die Stamme H 37 und Ro.

Dem Durchtesten weiterer TB-Stämme zur Erweiterung der Aussage waren zwar theoretisch keine, praktisch aber durchaus Grenzen gesetzt. Die Frage war, ob sich nicht auch unter Verzicht auf das statistische Ergebnis großer Versuchsreihen Anhaltspunkte dafür finden ließen, worauf eigentlich der Unterschied in der "Strahlenempfindlichkeit" der TB beruhe. Wir erinnerten uns der von J. Meissner und Mitarb. gemachten Beobachtungen über die Phosphataufnahme der Mycobacterien (1, S. 16) und folgten einer Anregung von Unverricht, Koehn, Oeser und Mitarb., welche sogen. Membranfilterkulturen anwandten, um die Bindung von radioaktivem Penicillin in Kulturen von penicillinempfindlichen und -resistenten Keimen zu untersuchen.

Das Prinzip dieser Methode besteht darin, die Kulturen nicht direkt auf dem Nährboden wachsen zu lassen, von dem sie dann nur durch Auswaschen getrennt werden können, sondern Membranfilter zu beimpfen, die auf den Nährboden aufgelegt sind und durch welche die Nährlösung hindurchdiffundiert. Ein Wechsel des Nährmediums kann zu jedem beliebigen Zeitpunkt dadurch erfolgen, daß die Membran mit den Kolonien vom Nährboden abgehoben und auf einen neuen Nährboden wieder aufgelegt wird. Abgesehen davon, daß uns dieses Verfahren in der Durchführbarkeit einfach erschien, waren wir auf seine Anwendung zur Trennung von Bakterien und Nährboden angewiesen, weil wir im Isotopenlabor keine Zentrifuge hatten, mit der wir das Auswaschen der TB aus der Nährbodensuspension hätten bewerkstelligen können.

Mit den vier uns bereits bekannten TB-Stämmen H 37, Ro, Ur und Hä wurde nun ein Vorversuch durchgeführt, bei dem geklärt werden sollte, ob

1. in den Petrischalen ein regelmäßiges und in seiner Stärke definierbares Wachstum der TB-Kolonien erfolgte,
2. das Wachstum auf die Membranfilteroberfläche, deren Durchmesser 4 cm betrug, beschränkt bliebe,
3. es nach einer bestimmten Expositionszeit möglich wäre, das Membranfilter mit den TB-Kolonien von der Nährbodenschicht abzuheben.

Die P-32-haltigen Nährböden wurden in Petrischalen angesetzt, ihre AK stieg von 10 auf 80 µc/ml an (s. Tab. 2223-3). Die Nährböden mit einer AK von 40 bis 80 µc/ml wurden mit einem Membranfilter belegt (s. 2272 und Abb. 2272-1 und 2272-2), auf das der Impftropfen der TB-Abschwemmung gebracht wurde. Entsprechend dem Vorgehen bei den anderen Versuchen wurden die Proben jeder Konzentrationsstufe sowie die inaktiven Kontrollen doppelt angesetzt. Die Bebrütung erfolgte wie üblich bei 37° . Es ergab sich folgendes:

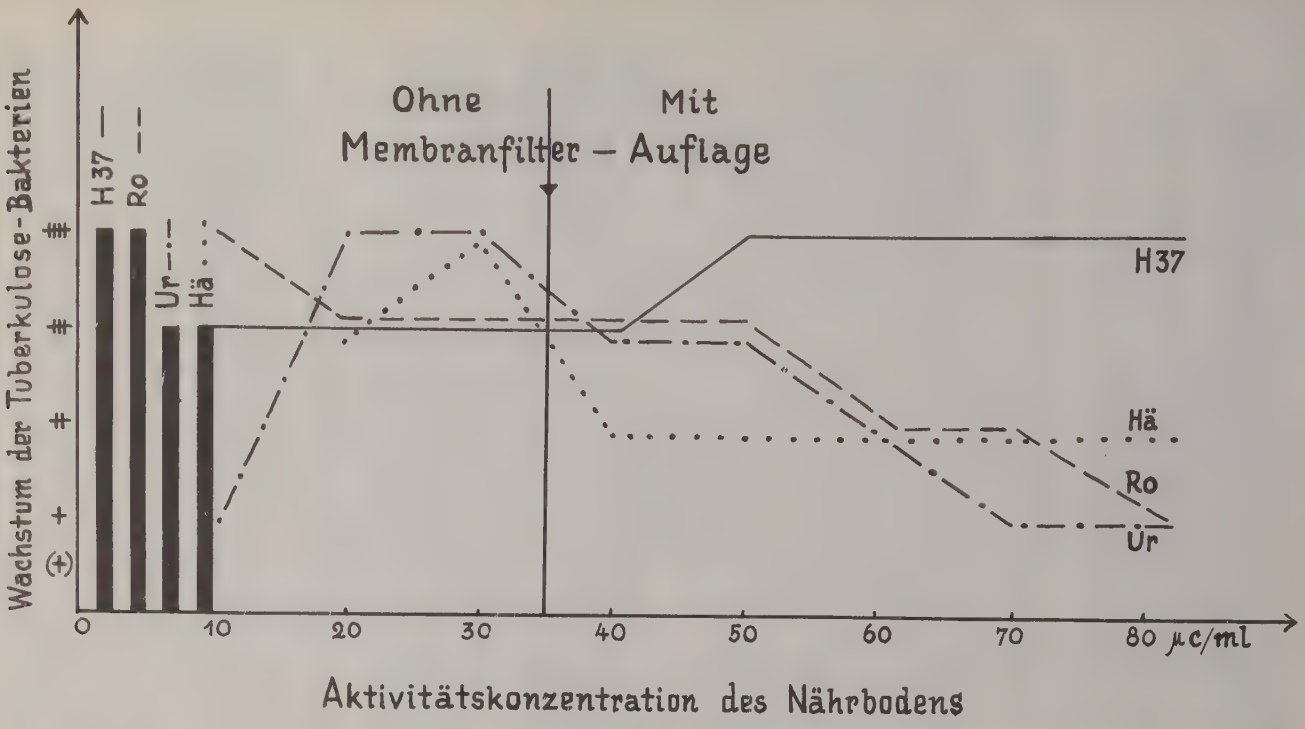
ad 1): Das Wachstum der TB in den mit Plastilin ringförmig abgedichteten Petrischalen erwies sich bei den Kontrollen als gut beurteilbar, meist gleichmäßig kräftig in Form eines mehr oder weniger dichten Rasens.

ad 2): Nur in wenigen Proben hatten sich die TB-Kolonien über die Grenzen der Membranfilterauflage ausgebreitet.

ad 3): Die Abhebbarkeit der Membranfilter mit den TB-Kolonien von der Nährbodenschicht setzte einen optimalen Feuchtigkeitsgehalt der Proben voraus; waren sie zu trocken, so ließen sich die Filter nur unvollständig ablösen; waren sie zu feucht, so blieben mehr oder weniger große Teile des Nährbodens an der Filterunterseite haften.

Die Ablesung des TB-Wachstums in den Petrischalen nach 20 Tagen Bebrütung ergab bei den Stämmen H 37, Ro und Hä dasselbe Bild wie in der Reagenzglasreihe (s. 312), nämlich ungestörtes Wachstum von H 37 bis zur maximalen AK von 80 µc/ml und Wachstumshemmung von Ro bei 60, von Hä bei 40 µc/ml. Im Gegensatz zur Reagenzglasreihe zeigte Ur in den Petrischalen eine deutliche Hemmung bei 60 µc/ml. Abb. 313-1 gibt einen Überblick.

Abb. 313-1



Wachstum von H 37 ——, Ro – – –, Ur – . – und Hä . . . auf P-32-haltigen Nährböden in Abhängigkeit von der Akrivitätskonzentration des Nährbodens. Petrischalen ohne und mit Membranfilterauflage.
(Die Säulen geben das Waxhstum der Kontrollen an.)

314 H 37, Ro, Ur und Hä sowie BCG, Hr, Ho und Bl auf P-32-haltigen Nährböden in Reagenzgläsern

Während wir daran arbeiteten, die oben beschriebenen Mängel der Membranfiltermethode zu beseitigen, führte unsere Suche nach Anhaltspunkten für die unterschiedliche "Strahlenempfindlichkeit" unserer TB-Stämme beim Vergleich der Versuchsergebnisse mit den Daten der Tab. 221-1 zu der Vermutung, daß vielleicht eine positive Korrelation bestehen könnte zwischen Chemosensibilität und "Strahlenresistenz" einerseits und zwischen Chemoresistenz und "Strahlensensibilität" andererseits. Daher wurden in einer neuen Versuchsreihe außer den bekannten Stämmen H 37, Ro, Ur und Hä vier weitere TB-Stämme von unterschiedlicher Chemosensibilität getestet: ein BCG und die drei Patientenstämme Hr, Ho und Bl (s. Tab. 221-1). Die 21 Tage alten Reinkulturen aller Stämme wurden durch regelmäßige Kulturpassagen aus den Ausgangskulturen erhalten und waren noch nicht radioaktiv exponiert.

Die in der üblichen Weise in Reagenzgläsern doppelt angesetzten P-32-haltigen Nährböden hatten diesmal eine AK von 20 bis 100 µc/ml im Verhältnis 2 : 4 : 6 : 8 : 10 (s. Tab. 2223-4).

Das Ergebnis des Wachstumsversuches entsprach bei den bekannten Stämmen H 37, Ro und Hä dem der vorangegangenen Versuchsreihen: Wachstumshemmung von Ro bei 40 µc/ml und von Hä bei 60 µc/ml, jedoch auch bei 100 µc/ml keine komplette Hemmung; ungestörtes Wachstum von H 37 bis 100 µc/ml. Ur zeigte ebenfalls ungestörtes Wachstum bis zur maximalen AK der Reihe.

Von den neu hinzugekommenen Stämmen ließen BCG, Ho und Bl bis 100 µc/ml keine Wachstumshemmung erkennen. Das Wachstum von Hr war deutlich gehemmt, aber erst bei der relativ hohen AK von 80 µc/ml.

In Abb. 314-1 sind diese Ergebnisse in der gewohnten Form graphisch dargestellt.

Wie bei den vier zuerst untersuchten fand sich also auch bei vier weiteren TB-Stämmen eine unterschiedliche Strahlenempfindlichkeit in Bezug auf das Wachstum in Gegenwart von P-32 im Nährboden.

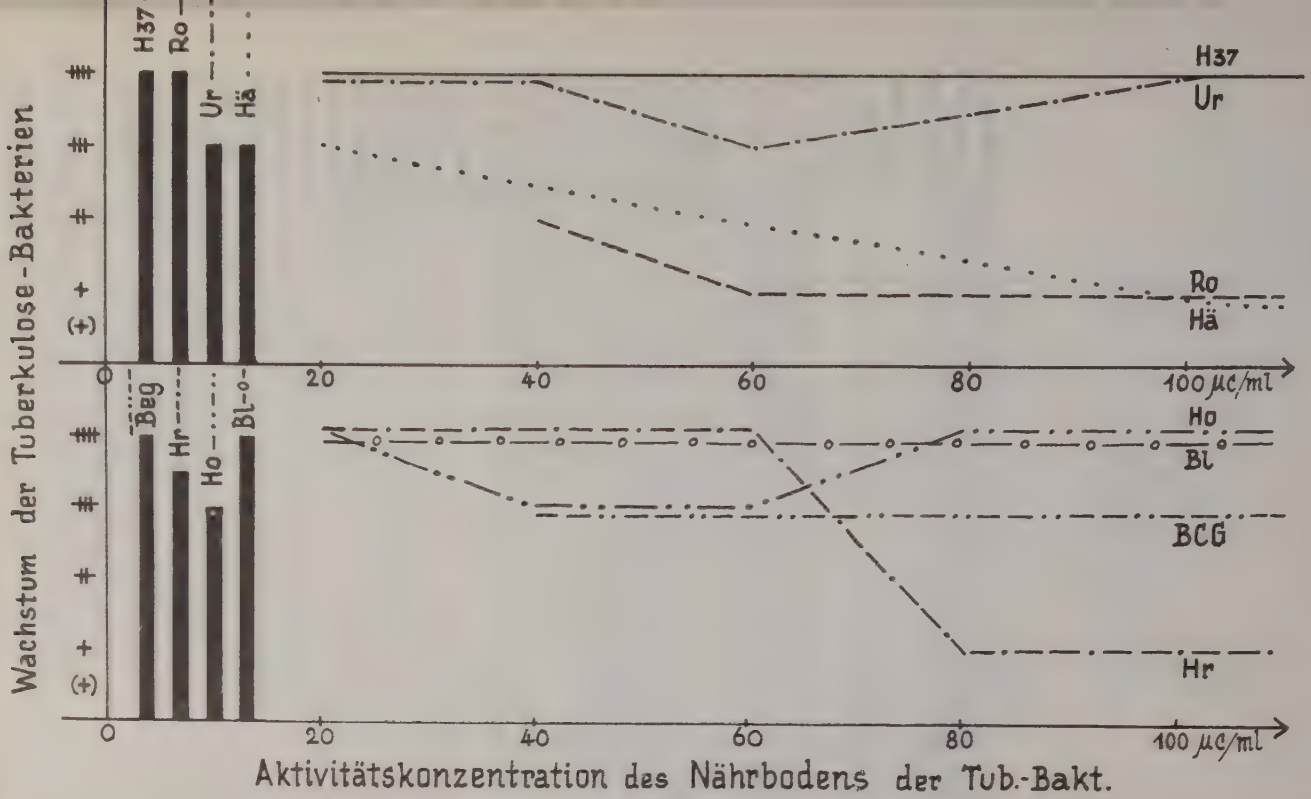


Abb. 314-1

Wachstum von H 37 ---, Ro - - -, Ur - . - und Hä . . . sowie von BCG -- . . --, Hr -- . -- . Ho - .. - und Bl -o- auf P-32-haltigen Nährböden in Abhängigkeit von der Aktivitätskonzentration des Nährbodens. Schrägröhrchen. (Die Säulen geben das Wachstum der Kontrollen an.)

315 H 37, BCG, Ro und Hä
auf P-32-freien Grundnährböden
unter P-32-Bestrahlung in Doppelröhrchen

In diesem zeitlich mit 314 parallel laufenden Versuch sollte geklärt werden, ob der beobachtete strahlenbiologische Effekt einer Wachstumshemmung bestimmter TB-Stämme auf P-32-haltigen Nährböden auch durch Bestrahlung zu erzielen, oder ob er von der Aufnahme des radioaktiven Phosphors durch die TB abhängig war. Diese Überlegungen führten zum Entwurf der unter 2273 beschriebenen Doppelröhrchen, in denen die TB auf P-32-freien Grundnährböden im Außenröhrchen wuchsen, dabei aber einer von der P-32-Lösung im Innenröhrchen ausgehenden Bestrahlung ausgesetzt waren, ohne P-32 inkorporieren zu können.

Mit Rücksicht auf die Schwächung der ß-Strahlung der im Innenröhrchen enthaltenen P-32-Lösung durch das Glas wurde die AK der einzelnen Proben, ausgehend von 20 µc/ml, im Verhältnis 2 : 4 : 7 : 9 : 12 gesteigert. Die Impulszahlenmessung der mit Nährboden und P-32-Lösung beschickten Doppelröhrchen ergab Werte, die in den drei höheren Konzentrationsstufen zwischen 75 und 100 % der mit derselben Mimik gemessenen Impulszahlen der einfachen Reagenzgläser entsprechender Konzentrationsstufe in der Versuchsreihe 314 lagen; d. h., die wachsenden TB-Kulturen waren auch in den Doppelröhrchen einer ionisierenden Strahlung ausgesetzt, über deren Spektrum wir allerdings auf Grund der ermittelten Impulsraten keine Aussage machen können. Die Ablesung des Wachstums der in den Doppelröhrchen angesetzten Stämme H 37, BCG, Ro und Hä nach 21 Tagen Exposition bzw. Bebrütung ergab bei allen vier Stämmen in allen AK-Stufen ein gleichmäßiges, kräftiges Wachstum von Bakterienrasen wie bei den Kontrollen.

32 Überblick über das Ergebnis der Versuche 311 - 315: TB-Wachstum in Gegenwart von P-32

Die folgende Tabelle 32-1 zeigt eine Zusammenstellung der Ergebnisse der Versuchsreihen 311 - 315:

Tab. 32-1

	Hemmwerte (AK in µc/ml) in der Versuchsreihe				
Nr.	311	312	313	314	315
Testgefäß	Reag. gl.	Reag. gl.	Petrisch.	Reag. gl.	Doppelr.
Ak_{max} µc/ml	70	80	80	100	100
H 37	> 70	> 80	> 80	> 100	> 100
Ro	50	60	60	60	> 100
Ur	-	?	60	> 100	-
Hä	-	50	40	60	> 100
BCG	-	-	-	> 100	> 100
Hr	-	-	-	80	-
Ho	-	-	-	> 100	-
Bl	-	-	-	> 100	-

Von 8 untersuchten TB-Stämmen wiesen zwei (Ro und Hä) eine reproduzierbare, in relativ engen Grenzen dosisabhängige Wachstumshemmung auf, wenn dem Nährboden steigende Mengen radioaktiven Phosphors in Form einer $Na_2HP^{32}O_4$-Lösung zugesetzt wurden. Ein Stamm (Hr), der allerdings nur in einer Versuchsreihe getestet wurde, ließ ebenfalls eine sehr markante Wachstumshemmung erkennen (s. Abb. 314-1), aber erst bei 80 µc/ml. Ein weiterer Stamm (Ur) verhielt sich bei wiederholter Testung in den Versuchsreihen 312 bis 314 nicht gleichmäßig, wobei einmal eine deutliche Wachstumshemmung, das nächste Mal keine Beeinflussung des Wachstums auftrat. Von den übrigen vier Stämmen wurde nur H 37 mehrfach untersucht. Er zeigte bis zu einer AK von 100 µc/ml keine Beeinflussung des Wachstums. Ebenso verhielten sich die Stämme BCG, Ho und Bl bei jeweils nur einer Versuchsreihe.

Das unterschiedliche Verhalten des Stammes Ur in zwei Versuchsreihen und das Ergebnis nur einer Versuchsreihe bei den Stämmen BCG, Hr, Ho und Bl halten wir für nicht auswertbar. Der Stamm Hä fiel aus technischen Gründen für unsere weiteren Untersuchungen leider aus. Wir haben daher das Ergebnis der Wachstumsversuche lediglich für die beiden im häufigsten untersuchten Stämme H 37 und Ro statistisch nachgeprüft:

In vier Versuchen (311 - 314 mit insgesamt 100 Einzelproben) trat die gleiche Kombination zweier Merkmale (Wachstumshemmung bei Ro, keine Wachstumshemmung bei H 37) bei vier möglichen Kombinationen viermal auf. Die Wahrscheinlichkeit, daß dieses Ergebnis zufallsbedingt ist, beträgt nach der Newton'schen Formel (Formel 43 in E. Weber, Grundriß der biologischen Statistik, Fischer Jena 1948) 1 : 341. Das Ergebnis ist somit statistisch gesichert.

Wir können also feststellen, daß die untersuchten TB in Bezug auf die Eigenschaft "Wachstum" unterschiedlich "strahlenempfindlich" waren. Der "Schwellenwert der Erkennbarkeit" (s. 1, S.10) für die Wachstumshemmung von TB durch radioaktiven Phosphor scheint etwa in der Größenordnung der hier angewandten Aktivitätskonzentrationen zu liegen. Die untere Grenze kann etwa bei 40 µc/ml Nährboden angenommen werden, die obere Grenze ist mit der maximalen AK unserer Versuche von 100 µc/ml Nährboden noch nicht erfaßt.

Das Ergebnis der Versuchsreihe 315 (letzte Spalte der Tab. 32-1) schien nun darauf hinzuweisen, daß es sich bei der Wachstumshemmung der TB durch P-32 trotz der in unseren Versuchen hervortretenden Dosisabhängigkeit nicht nur um ein einfaches quantitatives Problem handeln kann: bei annähernd gleich hoher Aktivität zeigten die in allen anderen Versuchen gehemmten Stämme Ro und Hä keine Wachstumshemmung in den Doppelröhrchen.

Die Bedingungen der Strahlenexposition der TB in den Doppelröhrchen unterschieden sich, wie wir gesehen haben (S.29 ff und S.43) in zweierlei Hinsicht von den Bedingungen im einfachen Reagenzglas und in der Petrischale:

1. konnte das radioaktive Phosphat von den TB nicht aufgenommen (inkorporiert) werden und
2. hatten die auf die TB einwirkenden Strahlen infolge des Durchgangs durch eine Glasschicht, in der ein bestimmter Anteil der ß-Strahlung absorbiert wurde, eine andere Qualität.

Die Frage, welcher von diesen beiden Faktoren zu dem Ausbleiben der Wachstumshemmung in Doppelröhrchenversuch führte, ist für die Theorie der wachstumshemmenden = tötenden Wirkung ionisierender (ß-) Strahlen von Bedeutung (s. hierzu 4, Besprechung der Untersuchungsergebnisse). Wir erwarteten zwar nicht, das Problem mit den uns zur Verfügung stehenden Mitteln lösen zu können, suchten aber doch wenigstens einen Eindruck zu gewinnen, ob sich denn unsere TB-Stämme in Bezug auf die P-32-Aufnahme aus dem Nährboden etwa ebenso wie in Bezug auf das Wachstum in Gegenwart von P-32 unterschieden. Die Tat-

sache, daß die Aufnahme P-32-markierter Metaphosphate bei verschiedenen TB-Kulturen verschieden groß sein kann, war ja schon von J. Meissner und Mitarb. dargelegt worden, die mit ihrer sehr exakten und kritisch ausgewerteten analytischen Methode eine Korrelation zwischen P-32-Aufnahme und Granulabildung der TB nachwiesen (1, S. 16). Unsere Fragestellung, aus dem Ergebnis der Wachstumsversuche 311 bis 315 in Anlehnung an die oben zitierte Arbeit von Unverricht, Koehn, Oeser und Mitarb. entwickelt, lautete:

Läßt sich eine Korrelation finden zwischen der P-32-Aufnahme und der am Wachstum gemessenen "Strahlensensibilität" der TB?

33 P-32-Aufnahme der TB aus P-32-haltigen festen Nährböden

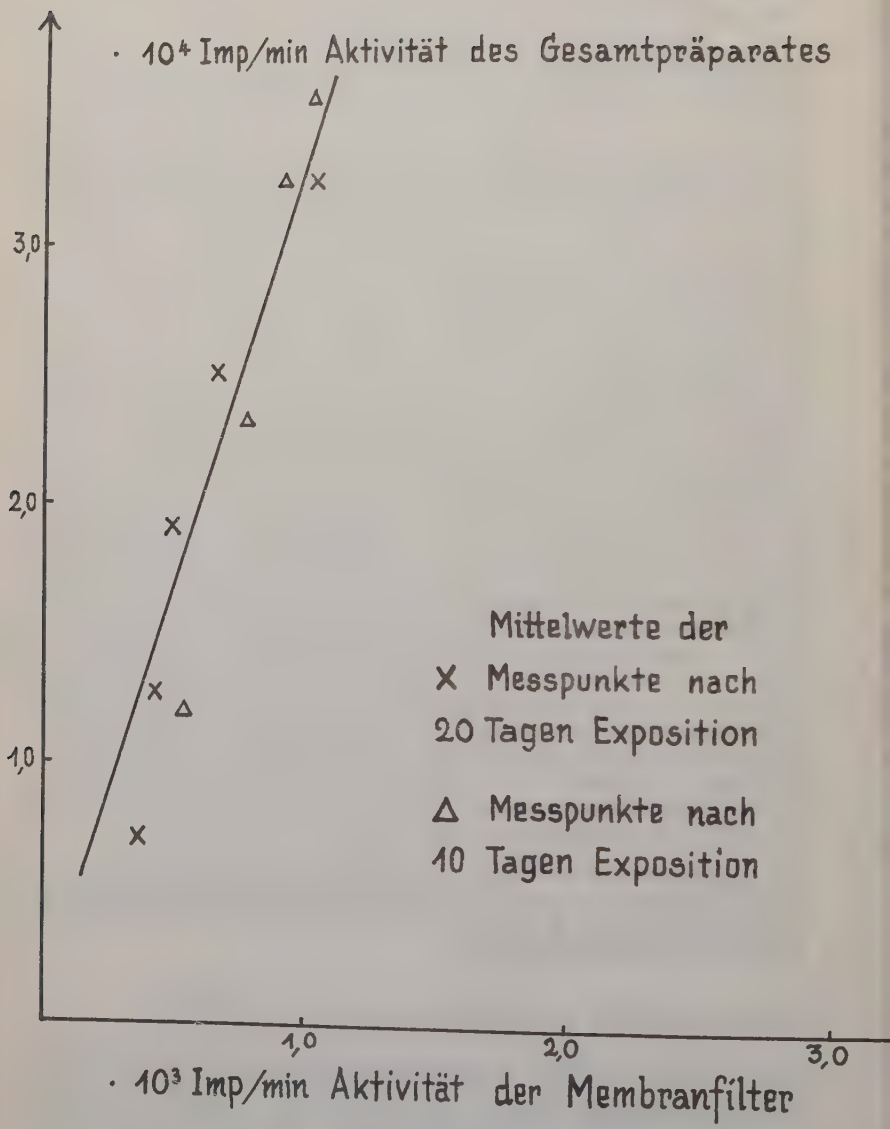
Zur Feststellung der Größe der P-32-Aufnahme der untersuchten TB-Stämme suchten wir die unter 313, Seite 38 bis 39 beschriebene Membranfiltermethode weiter auszubauen. Durch Markierung des Filterrandes mit einem Kohlestrich (Abb. 2272-2) und mit entsprechender Übung und Vorsicht bei der Aufbringung des Impftropfens auf die gleichmäßig feuchte und glatt aufliegende Membran gelang es fast immer, das Kolonienwachstum auf die Membranfilteroberfläche zu begrenzen. Ein optimaler Feuchtigkeitsgehalt der Kulturen konnte durch regelmäßiges Anfeuchten der Plastilinverschlußringe gesichert werden. Eine der Fehlerquellen dieser Methode, nämlich das Anhaften von Bestandteilen des radioaktiven Nährbodens an der Membranfilterunterfläche beim Abheben der Membran, dürfte damit im Mittel für alle Proben etwa gleich groß gewesen und, da ja nur die relativen und nicht die absoluten Werte interessieren, zu vernachlässigen sein. Meßfehler durch eine unterschiedliche Meßgeometrie bei der Bestimmung der Impulsrate der Proben suchten wir dadurch zu verkleinern, daß wir die vom radioaktiven Nährboden abgehobenen Membranfilter auf gleich hohe Schichten inaktiven Nährbodens in gleich großen Petrischalen übertrugen. Die unterschiedliche Dicke der Glaswände der Petrischalen folgte einer rein statistischen Verteilung und konnte daher ebenfalls nicht zu einer gerichteten Veränderung der Meßergebnisse führen. Am Ende der Expositions- bzw. Bebrütungszeit wurde mit dem Szintillationszähler zunächst die Impulsrate des Gesamtpräparates = Radioaktiver Nährboden + Membranfilter (+ Kolonien) in der Petrischale bestimmt, dann in gleicher Weise die Impulsrate der vom aktiven Nährboden abgehobenen und auf eine entsprechend hohe Schicht inaktiven Nährbodens übertragenen Membranfilter (+ Kolonien) und schließlich zur Kontrolle die Impulsrate des radioaktiven "Nährbodenrückstandes" ohne Membranfilter bzw. Membranfilter + Kolonien. Die errechnete Summe der beiden letzten Werte stimmte in allen Fällen mit den gemessenen Impulszahlen des Gesamtpräparates ausreichend überein:

Bei Impulsraten zwischen 9000 und 36 000 Imp/min und Nullwerten von 220 bis 225 Imp/min betrug die durchschnittliche Abweichung der errechneten Werte das 3.16-fache des Nullwertes bzw. 4% des gemessenen Wertes des Gesamtpräparates.

331 Leerversuche: P-32-Absorption in Membranfiltern

In einigen Leerversuchen wurde die Absorption von P-32 in nicht beimpften Membranfiltern Co 5 in Abhängigkeit vom P-32-Gehalt des Nährbodens geprüft. Wie die Abb. 331-1 zeigt, verläuft die P-32-Absorptionskurve der Membranfilter bei 10- und 20-tägiger Exposition auf P-32-haltigem Hohn/Substrat 4 linear. Die Membranfilter befinden sich also nach dieser Expostionszeit im Stadium der Sättigung, und ihr P-32-Gehalt ist dem P-32-Gehalt des Nährbodens direkt proportional.

Abb. 331-1



P-32-Absorption von Membranfiltern. Erläuterung im Text.

Wichtig für die Untersuchung der Phosphataufnahme der TB mittels der Membranfiltermethode war, daß alle Membranfilter von den TB-Kolonien gleich gut bewachsen waren, damit der Faktor "unterschiedliche Wachstumsstärke" als Ursache einer unterschiedlichen Phosphataufnahme ausgeschaltet wurde. Daher mußten die Nährböden in den Bakterienversuchen mit einer AK angesetzt werden, die mit einem Sicherheitsabstand unter dem niedrigsten gefundenen Wachstumshemmwert lag. Damit befanden wir uns zugleich in dem durch unsere Meßpunkte am besten definierten Abschnitt der Leer-Kurve. In dem relativ eng begrenzten Bereich konnte das AK-Gefälle der für einen Stamm angesetzten Probenreihe natürlich nur klein sein. Nach der Feststellung von H. Meissner und Mitarb., daß "die Kultur einen definierten Metaphosphatbedarf" durch Aufnahme aus der Nährlösung deckt (s. 1, S. 16), war jedoch der Nährboden-AK keine entscheidende Bedeutung für die P-32-Aufnahme der TB beizumessen - ungestörtes Wachstum vorausgesetzt. Im Gegensatz zu dem Ergebnis der Leerversuche erwarteten wir in den Bakterienversuchen keine Abhängigkeit der P-32-Aufnahme von der angebotenen Konzentration im Nährboden.

Abgesehen vom Wachstum der TB mußte ferner die Diffusion der Nährlösung durch die Membranfilter ungestört sein, das P-32-Angebot durfte nicht infolge von Diffusionsstörungen unter den Bedarf der Kolonien sinken. In dem interessierenden, durch den nicht gesicherten Verlauf unserer Membranfilter-Absorptionskurven zwischen O und dem ersten Meßpunkt bei etwa $7,5 \cdot 10^3$ Imp/min Nährbodenaktivität nach unten und dem niedrigsten gefundenen Wachstumshemmwert nach oben begrenzten AK-Bereich ergaben die Leerversuche keine Abhängigkeit der P-32-Absorption der Membranfilter von der Dauer der Exposition - d.h., der P-32-Gehalt der Membranfilter in % des P-32-Gehaltes des Nährbodens war nach 20 Tagen der gleiche wie nach 10 Tagen. Die Bakterienversuche konnten daher mit der üblichen Bebrütungs- = Expositionszeit von 20 Tagen durchgeführt werden.

332 H 37, Ro, Ur, Hr, Ho und Bl in Petrischalen auf Membranfiltern: P-32-Aufnahme aus festen Nährböden

Untersucht wurden die Stämme H 37, Ro, Ur, Hr, Ho und Bl. Da von den chemoresistenten Stämmen einigermaßen homogene Populationen untersucht werden sollten, wurden von Ro Kolonien aufgeschwemmt, die in Gegenwart von 50 γ/ml PAS gewachsen waren. Die Hr-Kolonien waren bei 10 γ/ml INH gewachsen. Von Bl wurden zwei Fraktionen angesetzt: Kolonien, die bei 10 γ/ml SM und solche, die bei 10 und 50 γ/ml INH gewachsen waren. Außer den Kontrollen auf P-32- freien Nährböden wurden parallel zu den Petrischalen-Membranfilter-Kulturen mit den gleichen AK-Stufen Kontrollen in Reagenzgläsern angesetzt. Ausgewertet wurden nur diejenigen Kulturen, bei denen

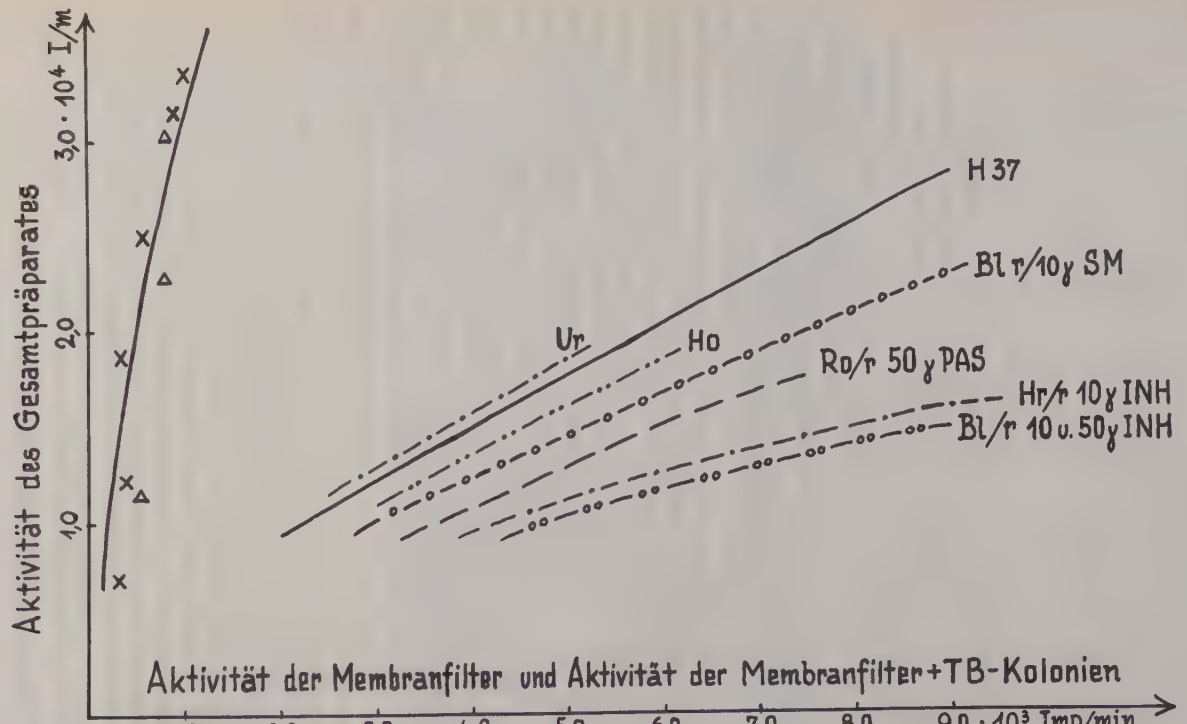
1. im Reagenzglas und in der Petrischale auf dem Membranfilter ein gleichmäßig dichtes Wachstum entsprechend Stufe +++ oder ++++ erfolgt,
2. der Membranfilterrand nicht überwuchert und
3. das Membranfilter mit den Kolonien vom Nährboden gut abhebbar war.

In Abb. 332-1, S. 51 , ist das Ergebnis der Versuche über die P-32-Aufnahme der TB analog zu Abb. 331-1 dargestellt: Aktivität (Imp/min) der Membranfilter + Kolonien als Ausdruck des P-32-Gehaltes nach 20 Tagen Bebrütung, in Abhängigkeit von der Aktivität (Imp/min) des Gesamtpräparates am Tage der Untersuchung als Maß der zu Versuchsbeginn im Nährboden angebotenen Aktivitätskonzentration. Zum Vergleich ist der Verlauf der "Leerkurve" im entsprechenden Aktivitätsbereich eingezeichnet.

Als erstes ist aus der Abb. 332-1 zu entnehmen, daß die P-32-Absorptionskurve der unbeimpften Membranfilter ("Leerkurve") und die Gruppe der P-32-Absorptionskurven der untersuchten TB-Stämme vollständig voneinander getrennt liegen, wobei die Absorptionskurven der Bakterien insgesamt flacher verlaufen als die Kurve der Leerversuche. Wir haben berechnet, daß die Filter allein bei den verschiedenen Aktivitätskonzentrationen im Durchschnitt 3,995 % der Gesamtaktivität aufgenommen haben. Bei den TB-bewachsenen Filtern betrug der Mittelwert der prozentualen Aufnahme für die AK 2 (20 µc/ml Nährboden) 37,4 %. Diese Differenz ist statistisch signifikant, da die Überschreitungswahrscheinlichkeit unter 0,27 % liegt.

Unter gleichen Bedingungen sind demnach von den TB-bewachsenen Membranen wesentlich größere Mengen P-32 aufgenommen worden als von den Membranen ohne TB. Die einzige Erklärung dafür ist, daß die TB-Kolonien weitgehend unabhängig vom vorhandenen Konzentrationsgefälle aktiv P-32-haltige Verbindungen aus dem Nährboden aufgenommen haben, während für die Absorption dieser Verbindungen in

Abb. 332-1



P-32-Aufnahme von H 37, Ro, Ur, Hr, Ho und Bl (Membranfilter-Kulturen). Erläuterung im Text

den unbeimpften Membranfiltern nach dem Eintreten des Sättigungswertes offenbar das Konzentrationsgefälle maßgebend ist. Dieses Ergebnis stimmt hinsichtlich der P-32-Aufnahme der TB mit dem von J. Meisner und Mitarb. mittels einer anderen Methodik gewonnenen überein.

Im Kurvenbereich der Bakterienversuche zeigt sich nun ein gewisser Unterschied der P-32-Aufnahme der einzelnen Stämme. Die obere Grenze ist durch die P-32-Aufnahmekurven von H 37 und Ur gegeben, die demnach von den untersuchten TB-Stämmen die geringste P-32-Aufnahme aufweisen. An der unteren Grenze des Kurvenbereiches verlaufen die Kurven von Hr und von derjenigen Fraktion von Bl, die gegen 10 und 50 γ INH resistent ist: Diese beiden Stämme nehmen offenbar mehr P-32 auf als der Laborstamm H 37 und der Patientenstamm Ur. Die P-32-Aufnahmekurven der Stämme Ho und Ro und der in Gegenwart von 10 γ SM gewachsenen Fraktion von Bl liegen zwischen den durch H 37 und Ur sowie Hr und Bl/r 10 und 50 γ INH gegebenen Grenzbereichen so verteilt, daß Ho und Bl/r 10 γ SM eine geringere P-32-Aufnahme erkennen lassen als Ro.

Bei der kleinen Zahl der Versuche (insgesamt 42 auswertbare Einzelproben TB-bewachsener Filter) ließen sich die Unterschiede der P-32-Aufnahme der einzelnen Stämme nicht statistisch sichern. Im Vergleich mit der üblichen Methode der mehrmaligen Auswaschung der Bakterien und Berechnung der danach feststellbaren Aktivität auf das Bakterientrockengewicht ist mit dem Membranfilterversuch auch nur eine grobe Orientierung möglich. Mit diesem Vorbehalt glauben wir aussagen zu dürfen, daß die in unseren Versuchen durch P-32 nicht wachstumsgehemmten Stämme H 37, Ur und Ho weniger P-32 aufgenommen haben als der bei höheren P-32-Konzentrationen im Wachstum gehemmte Stamm Ro. Bei den Stämmen Hr und Bl ist das Ergebnis des nur einmal durchgeführten Wachstumsversuches (s. Tab. 32-1) zu unsicher, als daß man eine Korrelation zur P-32-Aufnahme herstellen könnte. Immerhin scheint es uns nach dem gewonnenen Eindruck lohnend, mit entsprechend feinerer Methodik noch einmal der Frage nachzugehen, ob zwischen dem P-32-Aufnahmequotienten eines TB-Stammes und dem Wachstum seiner Kolonien auf P-32-haltigem Nährboden eine Beziehung besteht.

34 TB-Wachstum auf glyzerinhaltigen und glyzerinfreien Nährböden nach Exposition auf P-32-haltigen Nährböden mit Glyzerin

Den Abschluß unserer Versuche über das TB-Wachstum während oder nach Exposition auf P-32-haltigen Nährböden bildete die Untersuchung, ob es nach der P-32-Exposition zu einer Veränderung des TB-Wachstums auf glyzerinhaltigen und glyzerinfreien Nährböden käme.

Das Verhalten der Ausganskulturen auf glyzerinfreien und glyzerinhaltigen Nährböden ist in Tab. 221-1 angegeben: Bei allen untersuchten Stämmen fand sich ein üppiges Wachstum auf den glyzerinhaltigen und ein geringeres, oft nur kümmerliches Wachstum auf den glyzerinfreien Nährböden.

Zur Prüfung der Stabilität dieser Eigenschaft wurden von H 37 und Ro nach 14 Tagen Exposition auf P-32-haltigen Nährböden mit einer maximalen AK von 70 µc/ml (s. 311) Subkulturen auf inaktiven Nährböden von Grundsubstrat mit und ohne Glyzerin angelegt. Das Wachstum dieser Subkulturen wurde nach 21 Tagen abgelesen: Die H-37-Kulturen zeigten einschließlich der Kontrollen, die nicht radioaktiv exponiert gewesen waren, auf glyzerinhaltigen und glyzerinfreien Nährböden gleichmäßig kräftiges Wachstum, während Ro in Gegenwart von Glyzerin üppig, auf den glyzerinfreine Nährböden dagegen im ganzen weniger gut gewachsen war - also etwa das an den Ausgangskulturen beobachtete Verhalten aufwies. Eine Abhängigkeit des Wachstums von der den Ausgangskulturen angebotenen P-32-Konzentration des radioaktiven Nährbodens war bei den Subkulturen nicht zu erkennen. Das Versuchsergebnis ist in der üblichen Weise in Abb. 34-1 dargestellt.

Nach insgesamt 35 Tagen Exposition auf P-32-haltigen Nährböden wurden nochmals Subkulturen von H 37 und Ro auf inaktiven Grundnährböden mit und ohne Glyzerin angelegt. Beim Ablesen des Wachstums der Subkulturen nach 21 Tagen ergab sich für Ro das gleiche Bild, wie nach 14-tägiger P-32-Exposition der Ausgangskulturen, also ein unregelmäßiges und im ganzen geringeres Wachstum auf den glyzerinfreien Nährböden ohne sichere Abhängigkeit von der AK der Nährböden der Ausgangskulturen. Auch H 37 zeigte diesmal deutlich ein unterschiedliches Wachstum auf glyzerinfreien und glyzerinhaltigen Nährböden, entsprechend dem Verhalten bei der Erstuntersuchung vor der radioaktiven Exposition (Tab. 221-1).

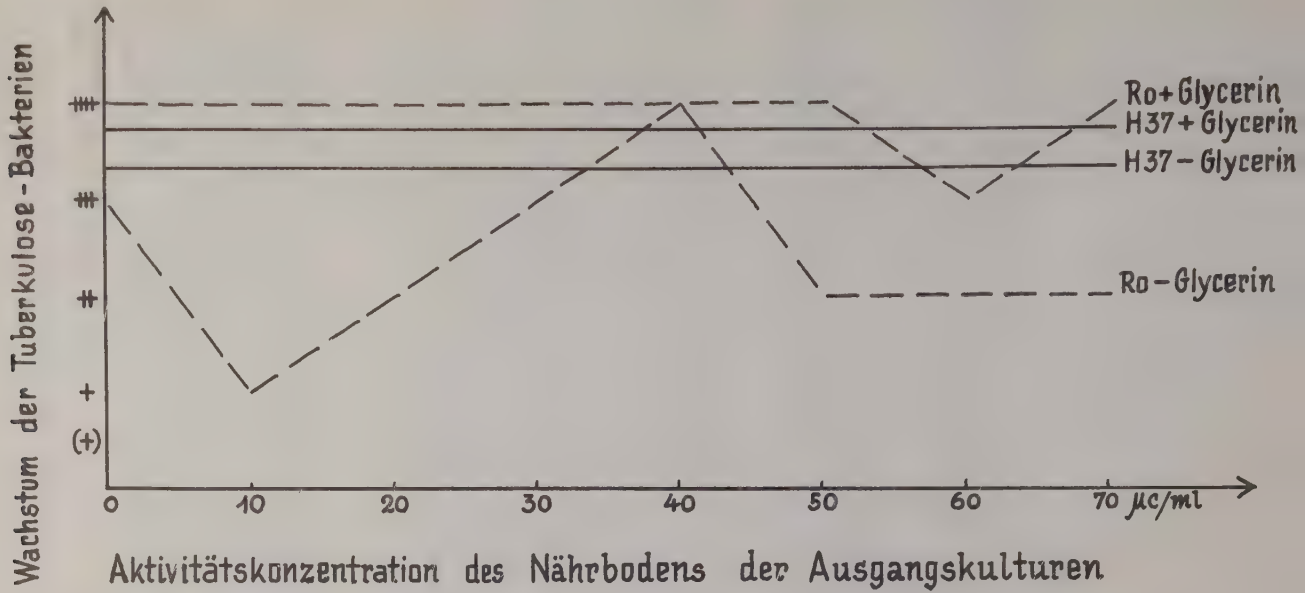


Abb. 34-1

Wachstum der Subkulturen von H 37 —— und Ro - - - auf glyzerinhaltigen (+ Glyzerin) und glyzerinfreien (- Glyzerin) Nährböden nach 14-tägiger Exposition der Ausgangskulturen auf P-32-haltigen Nährböden, in Abhängigkeit von der Aktivitätskonzentration im Nährboden der Ausgangskulturen. (Die Kurven H 37 + Glyzerin und H 37 - Glyzerin stellen eine Resultierende der dosisunabhängig zwischen ++++ und +++ schwankenden Ablesewerte dar.)

Das Versuchsergebnis läßt sich im einzelnen aus Abb. 34-2 entnehmen. (s. Seite 56)

Die beiden Versuche (Abb. 34-1 und 34-2) hatten nur eine orientierende Bedeutung, die Frage des Wachstums der TB auf glyzerinfreien und glyzerinhaltigen Nährböden und seiner Beeinflußbarkeit durch P-32 wurde nicht weiter verfolgt. Nachdem die Erstuntersuchung der Ausgangskulturen zur Charakterisierung der verarbeiteten TB-Stämme durchweg ein besseres Wachstum auf glyzerinhaltigen, als auf glyzerinfreien Nährböden ergeben hatten (Tab. 221-1), wurden in den Versuchen 311 bis 315 ausschließlich glyzerinhaltige radioaktive Nährböden verwendet, da es für die Auswertung wichtig schien, daß - abgesehen von dem zur Diskussion stehenden P-32- optimale Wachstumsbedingungen für die TB herrschten.

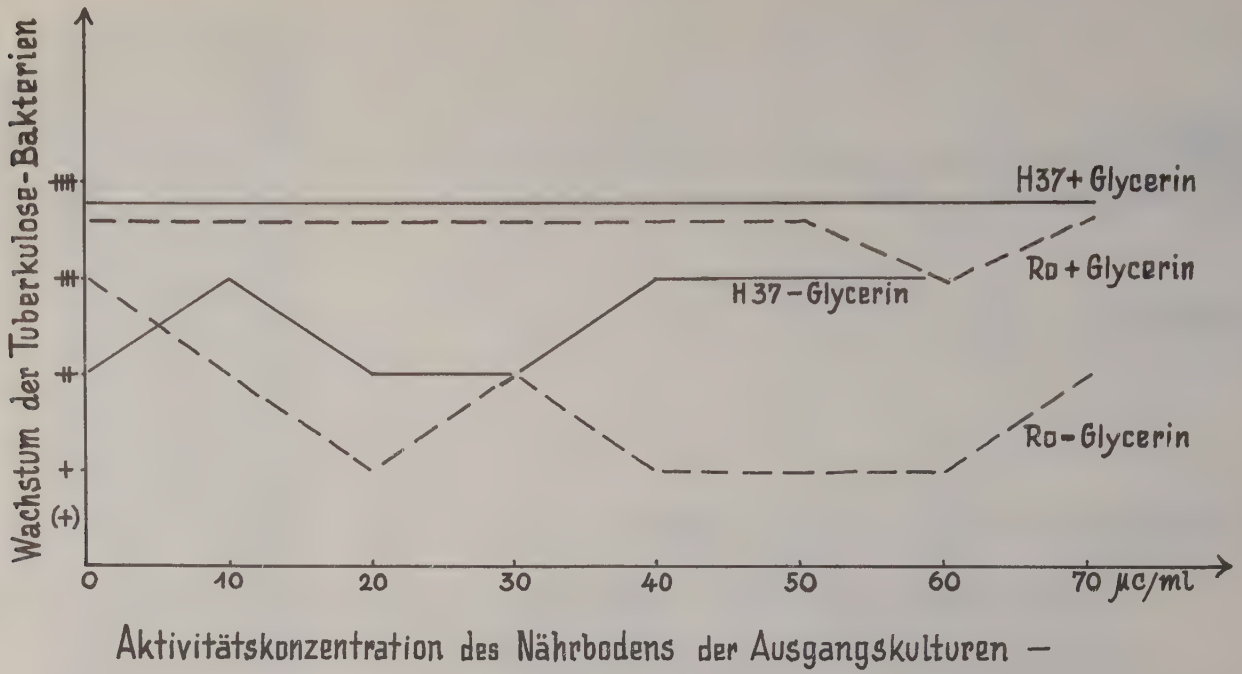


Abb. 34-2

Wachstum der Subkulturen von H 37 --- und Ro - - - auf glyzerinhaltigen (+ Glyzerin) und glyzerinfreien (– Glyzerin) Nährböden nach 35-tägiger Exposition der Ausgangskulturen auf P-32-haltigen Nährböden, in Abhängigkeit von der Aktivitätskonzentration im Nährboden der Ausgangskulturen. (Die Kurven H 37 + Glyzerin und Ro + Glyzerin stellen eine Resultierende der P-32-dosisunabhängig zwischen ++++ und +++ schwankenden Ablesewerte dar.)

35 Katalase-Aktivität der TB nach Exposition auf P-32-haltigen Nährböden

Die an unsere ersten Wachstumsversuche angeschlossenen Untersuchungen über die P-32-Aufnahme der TB (33) und über ihr Wachstum auf Nährböden mit und ohne Glyzerin (34) führen logischerweise zur Frage der Beeinflußbarkeit des TB-Stoffwechsels durch P-32. Aus dem großen Komplex der Möglichkeiten, das Stoffwechselverhalten der TB in Gegenwart von P-32 oder nach Exposition auf P-32-haltigen Nährböden zu analysieren, griffen wir zwei Themen heraus, die miteinander in einem gewissen Zusammenhang zu stehen scheinen: Die Katalase-Aktivität als Reaktion des Fermentstoffwechsels und die Resistenz gegen einige, wegen ihres inhibitorischen Effektes bei der Tuberkulosebehandlung verwendete chemische Mittel.

Tab. 221-1 zeigt die Katalase-Aktivität (Bestimmungsmethode s. unter 216) der Ausgangskulturen unserer acht untersuchten TB-Stämme vor der radioaktiven Exposition. Die Reaktion war positiv bei H 37, BCG, Ur und Hä - negativ bei Ro, Hr und Bl; bei Ho fiel sie wechselnd positiv und negativ aus.

Dieses Ergebnis stimmt mit den Befunden von Middlebrook, Cohn und Schäfer sowie Bönicke überein, welche feststellten, daß gegen 10 γ/ml INH und mehr resistente TB-Stämme immer nahezu oder vollständig Katalase-negativ, INH-empfindliche Stämme dagegen Katalase-positiv sind. Die INH-Hemmtiter unserer TB-Stämme lassen sich im Überblick gleichfalls aus Tab. 221-1 ablesen. Ergänzend sei hierzu auf Tab. 361-1 in Abschnitt 361 hingewiesen. Sie bringt eine Zusammenstellung der gefundenen "spontanen" Hemmtiter-Schwankungen bei wiederholten Resistenzprüfungen der durch Kulturpassagen weitergezüchteten, nicht radioaktiv exponierten TB-Stämme. Dabei zeigt sich, daß dem wechselnden Ausfall der Katalase-Reaktion beim Stamm Ho eine starke Veränderung des INH-Hemmtiters entspricht, der anfangs über 50 γ/ml liegt (= "volle Resistenz"), einige Monate später auf unter 0,05 γ/ml abfällt (= "volle Empfindlichkeit") und dann wieder auf 50 γ/ml ansteigt. Daraus ist zu schließen, daß bei diesem Stamm in Bezug auf INH-Sensibilität und Katalase-Aktivität eine heterogene Population vorlag, wobei zeitweise die INH-resistenten und Katalase-negativen, dann wieder die INH-empfindlichen und Katalase-positiven Populationsanteile überwogen und das Verhalten der Gesamtpopulation bestimmten. Da die Kulturpassagen immer unter den gleichen Bedingungen angelegt wurden, ist uns die Ursache für das Überwiegen des einen oder des anderen Populationsanteiles nicht bekannt. Jedenfalls macht aber die Instabilität des Ausfalls der Katalase-Reaktion den Stamm Ho als Testobjekt für unsere Fragestelltung - Beeinflußbarkeit der Katalase-Aktivität durch P-32 - ungeeignet.

Wie aus Tab. 361-1 hervorgeht, zeigt außer Ho auch der Stamm Ro spontan gewisse Schwankungen des Hemmtiters für INH, allerdings im Vergleich zu Ho mit weniger großer Amplitude. Leider wurde zum Zeitpunkt der beiden niedrigsten Hemmtiter von 5 γ/ml, die also nach

Middlebrook u.a. unterhalb der kritischen Grenze der Katalase-Positivität liegen, eine Kontrolle der Katalase-Reaktion nicht vorgenommen. Bei allen anderen Kontrollen war die Katalase-Reaktion in Übereinstimmung mit einem INH-Hemmtiter von mindestens 10 γ/ml negativ. Der Stamm Ro wurde daher unter einem gewissen Vorbehalt in die Untersuchungsreihe zur Frage der Katalase-Aktivität nach P-32-Exposition mit aufgenommen.

Tab. 35-1 zeigt nun den Ausfall der Katalase-Reaktion bei den Stämmen H 37, BCG, Ur, Hä, Ro, Hr und Bl nach verschieden langer Exposition auf P-32-haltigen Nährböden unterschiedlicher AK. In der letzten Spalte sind zum Vergleich die Ergebnisse des Katalase-Versuches bei den nicht radioaktiv exponierten, 21 Tage alten Kulturen derselben TB-Stämme eingetragen.

Tab. 35-1

Stamm	Exp.-zeit d	AK µc/ml	Ausfall der Katalase-Reaktion nach P-32-Exposition	vor P-32-Exposition
H 37	14	80	+++	+++/+++
	21	100	+++	+++/ ++
	35	70	++	
BCG	21	100	++	++/+/++
Ur	21	60	++	++/ ++
		100	++	++/ +
Hä	21	50	+++	
		100	+++	+++/+++
Ro	14	50	ø	
	21	100	ø	ø / ø
	35	70	ø	ø / ø
Hr	21	80	ø	ø / ø / ø / ø
Bl	21	100	ø	ø / ø / ø / ø

Im Vergleich zum Ausgangsbefund ist, wie sich aus der Tabelle ablesen läßt, weder bei den Katalase-positiven, noch bei den Katalase-negativen TB-Stämmen eine Veränderung der Katalase-Aktivität nach Exposition auf P-32-haltigen Nährböden aufgetreten. Auch die Korrelation zwischen INH-Resistenz bzw. -sensibilität und negativer bzw. positiver Katalase-Reaktion blieb, wie wir im folgenden Abschnitt zeigen werden, unverändert. Mit Bezug auf unsere bisherigen Versuchsergebnisse ist festzustellen, daß weder die auf P-32-haltigen Nährböden im gegebenen Aktivitätsbereich im Wachstum gehemmten, noch die im Wachstum unbeeinflußten, weder die relativ viel, noch die relativ wenig P-32 aus dem Nährboden aufnehmenden TB eine sichere Beeinflussung der Katalase-Aktivität nach Exposition auf P-32-haltigen Nährböden erkennen lassen, wobei die maximale AK 100 µc/ml und die maximale Expositionszeit 35 Tage betrug.

36 Chemoresistenz der TB nach Exposition auf P-32-haltigen Nährböden

Das Verhalten der Chemoresistenz bzw. -sensibilität unserer TB-Stämme nach der Exposition auf P-32-haltigen Nährböden erschien unter zweierlei Gesichtspunkten interessant: einmal handelt es sich bei der Chemoresistenz um eine bestimmte, aber im Einzelfall bisher nicht bekannte Stoffwechselfunktion der Bakterien, zum anderen ist nach unseren heutigen Vorstellungen diese Stoffwechselfunktion erblich und ihr Entstehen an mutative Veränderungen gebunden, von denen wir wissen, daß sie mit einer Rate von ca. 10^{-6} spontan auftreten (1, S.). Da provozierte Mutationen qualitativ den spontan auftretenden entsprechen (1, S.), müßten Resistenz oder Sensibilität der TB durch eine geeignete "mutagen" wirkende Behandlung hervorgerufen werden können.

Für unsere Resistenzversuche ergaben sich daher zwei Fragestellungen:

1. Läßt sich durch die Einwirkung von P-32 die Mutationsrate der Chemoresistenz der TB quantitativ oder qualitativ verändern?
2. Läßt sich auf diesem Wege möglicherweise etwas Näheres über die Stoffwechselfunktion erfahren, die der Resistenzentwicklung zugrunde liegt?

361 Chemoresistenz der TB ohne radioaktive Exposition

Da es sich darum handelte, die Beeinflußbarkeit der Chemoresistenz oder -sensibilität der TB durch P-32 festzustellen, wurde zunächst die Stabilität der bei der ersten Untersuchung gefundenen Hemmtiter gegen Sm, PAS, Cont und INH geprüft: Bei den durch regelmäßige Kulturpassagen weitergezüchteten 8 TB-Stämmen H 37, BCG, Ur, Hä, Ro, Hr, Ho und Bl, die unter konstanten Kulturbedingungen gehalten wurden und weder mit Radiophosphor noch mit irgendeiner anderen Strahlenquelle in Berührung kamen, wurden die Resistenzbestimmungen während der gesamten Dauer unserer Untersuchungen von Zeit zu Zeit wiederholt. Die Ergebnisse dieser Kontrollen sind für die sensiblen und resistenten Keime in den beiden folgenden Tabellen 361-1 und 361-2 zusammengestellt. Die Hemmwerte für den Stamm H 37 sind identisch mit dem Wachstum der Kontrollen bei der jeweiligen Bestimmung und sind daher auch bei der resistenten Keimgruppe in Tab. 361-2 als Bezugswerte mit aufgeführt. In der letzten Spalte beider Tabellen sind außerdem die Ergebnisse der Katalase-Reaktion eingetragen.

Tab. 361-1

Datum der Ablesung	Hemmwert in γ/ml für : SM	PAS	Cont	INH	Katalase-Reaktion
H 37					
30. 8. 56	5	< 1	1	0,1	-
18. 10. 56	1	< 1	1	0,05(+)	-
20. 2. 57	5	< 1	1(+)	0,1	-
22. 3. 57	1(+)	< 1	1(+)	0,1	+++
15. 5. 57	-	-	-	-	+++
4. 6. 57	5	< 1	1(+)	< 0,05	+++
26. 7. 57	< 1	< 1	1(1K)	0,1	-
10. 9. 57	-	-	-	-	++
BCG					
20. 2. 57	5	5(+)	1(+)	-	++
22. 3. 57	5	5	< 1	0,1(+)	-
15. 5. 57	-	-	-	-	+
4. 6. 57	5	-	1(+)	0,1(+)	++
Ur					
30. 8. 56	5(+)	< 1	< 1	0,1	++
15. 5. 57	-	-	-	-	++
4. 6. 57	5	< 1	1(+)	0,1	++
26. 7. 57	< 1	< 1	< 1	-	-
10. 9. 57	-	-	-	-	+
Hä					
18. 10. 56	< 1	< 1	1(+)	-	++
22. 3. 57	5	< 1	< 1	0,1(+)	-
15. 5. 57	-	-	-	-	+++

Ergebnis wiederholter Resistenzbestimmungen bei den sensiblen TB-Stämmen H 37, BCG, Ur und Hä bei regelmäßigen Kulturpassagen ohne Bestrahlung.

Tab. 361-2

Datum der Ablesung	Hemmwert in γ/ml für: SM	PAS	Cont	INH	Katalase-Reaktion
H 37					
3. 8. 56	5	< 1	1	0,1	-
22. 11. 56	1	< 1	1	0,5	-
5. 12. 56	1	< 1	1	0,05	+++
22. 3. 57	1(+)	< 1	1(+)	0,1	+++
15. 4. 57	5	< 1	< 1	0,1	-
23. 4. 57	10(+)	< 1	< 1	0,1(1K)	-
15. 5. 57	-	-	-	-	+++
4. 6. 57	5	< 1	1(+)	< 0,05	+++
2. 7. 57	5	< 1	1(+)	0,05(+)	-
26. 7. 57	< 1	< 1	1(1K)	0,1	-
23. 8. 57	10(+)	< 1	1(+)	0,1(2K)	-
10. 9. 57	-	-	-	-	++
Ro					
3. 8. 56	> 50	> 50	1(+)	50(+)	ø
22. 3. 57	5	> 50	< 1	5	-
23. 4. 57	1(+)	50(+)	< 1	5	-
15. 5. 57	-	-	-	-	ø
4. 6. 57	5	> 50	1(2K)	10(1K)	ø
2. 7. 57	-	-	-	10	-
26. 7. 57	< 1	50(+)	< 1	50	-
23. 8. 57	1(+)	> 50	< 1	-	-
10. 9. 57	-	-	-	-	ø
Hr					
22. 11. 56	> 50	> 50	< 1	> 50	ø
22. 3. 57	50	-	< 1	> 50	-
15. 5. 57	-	-	-	-	ø
4. 6. 57	-	> 50	1(+)	> 50	ø
2. 7. 57	50	-	-	-	-
10. 9. 57	-	-	-	-	ø
Ho					
22. 11. 56	> 50	5	1(+)	> 50	ø
22. 3. 57	10	< 1	5(+)	> 50	-
15. 4. 57	< 1	< 1	< 1	< 0,05	-
15. 5. 57	10	< 1	1(+)	0,05(+)	++
4. 6. 57	5	< 1	< 1	50	ø
10. 9. 57	-	-	-	-	ø
Bl					
5. 12. 56	> 50	< 1	< 1	> 50	ø
22. 3. 57	> 50	< 1	1(+)	-	-
15. 4. 57	> 50	< 1	< 1	> 50	ø
15. 5. 57	-	-	-	-	ø
4. 6. 57	50(+)	< 1	< 1	> 50	ø
2. 7. 57	-	-	-	> 50	-
Bl/r 10 SM					
26. 7. 57	10(+)	< 1	< 1	50(+)	-
Bl/r 50 INH					
26. 7. 57	10(+)	< 1	< 1	50(+)	-
10. 9. 57	-	-	-	-	ø

Ergebnis wiederholter Resistenzbestimmungen bei den resistenten TB-Stämmen Ro, Hr, Ho und Bl bei regelmäßigen Kulturpassagen ohne Bestrahlung.

Wie aus Tabelle 361-1 hervorgeht, verhielten sich die Hemmtiter der sensiblen Stämme H 37, BCG, Ur und Hä während der Beobachtungszeit von etwa einem Jahr konstant. Die geringen Titerschwankungen sind trotz einzelner Widersprüche (Frhr. v. Vietinghoff-Scheel) nach der allgemeinen Erfahrung darauf zurückzuführen, daß insbesondere SM hitzelabil ist, so daß bei der Resistenzbestimmung auf festen Eiernährböden durch die Koagulationstemperatur von 80° die Konzentration dieses Antibiotikums im Nährboden auf etwa 1/2 bis 1/3 absinkt (G. Meissner u.a.).

In Übereinstimmung mit der Konstanz der Hemmtiter findet sich bei den sensiblen Stämmen ein in der Stärke zwar etwas wechselnder, immer aber positiver Ausfall der Katalase-Reaktion. Anders sieht es bei den resistenten Stämmen der Tab. 361-2 aus. Die Kulturen von Ro, Hr, Ho und Bl zeigten nur zum Teil ein gleichbleibendes Ergebnis der Reistenzprüfungen - zum Teil kam es zu erheblichen spontanen Schwankungen zwischen "voller" Sensibilität und "voller" Resistenz oder zum Resistenzverlust. Alle vier Stämme waren und blieben voll empfindlich für Conteben, die Stämme Ho und Bl außerdem für PAS. Ro und Hr waren konstant voll resistent gegen PAS, Hr außerdem gegen SM und INH, ferner Bl gegen INH. Die Stämme Ro, Ho und Bl verloren ihre anfangs nachweisbare Resistenz gegen SM (Bl nach 7 Monaten !), bei Ro und Ho wechselten die Hemmtiter für INH ungerichtet zwischen "voll sensibel" und "voll resistent". Das definitive, für den folgenden Abschnitt wesentliche Ergebnis der Untersuchungsreihen über die Stabilität der Chemoresistenz bei unseren 8 TB-Stämmen sei in Tab. 361-3 nochmals zusammengestellt:

Tab. 361-3

Stamm	Verhalten gegen :			
	SM	PAS	Cont	INH
H 37	sensibel	sensibel	sensibel	sensibel
BCG	sensibel	sensibel	sensibel	sensibel
Ur	sensibel	sensibel	sensibel	sensibel
Hä	sensibel	sensibel	sensibel	sensibel
Ro	Resistenz-verlust	resistent	sensibel	wechselnd resistent u. sens.
Hr	resistent	resistent	sensibel	resistent
Ho	Resistenz-verlust	sensibel	sensibel	weschselnd resistent u. sens.
Bl	Resistenz-verlust	sensibel	sensibel	resistent

Ergebnis der innerhalb eines Jahres mehrfach wiederholten Resistenzbestimmungen gegen SM, PAS, Cont und INH bei 4 sensiblen und 4 unterschiedlich resistenten TB-Stämmen H 37, BCG, Ur, Hä und Ro, Hr, Ho, Bl (Erläuterungen im Text).

Auch andere Autoren haben bei gleichartiger Versuchsanordnung spontane Veränderungen der chemotherapeutischen Hemmwerte resistenter TB oder anderer Erreger gefunden. Diesem Phänomen scheint das allgemeine, nicht nur für die Chemoresistenz geltende Prinzip der Populationsheterogenität zugrunde zu liegen (F.-J. Pothmann, G. Henneberg, G. Meissner, G. Meissner und G. Berg, L. Heilmeyer u.a.). Es war bereits die Rede davon, daß sich in einer chemosensiblen Bakterienpopulation immer wenigstens in Höhe der spontanen Mutationsrate von etwa 1 auf 10^6 bis 10^8 resistente Keime finden (unter 1, S.8/9- unter 35, S.57 f- unter 36 S. 59). Diese Keime haben in Gegenwart des betreffenden Chemotherapeutikums vor den anderen Populationsanteilen einen Selektionsvorteil, der dazu führen kann, daß sie die sensiblen Keime der Population völlig überwuchern: Der ganze Stamm erscheint dann resistent. Erst wenn der Antibiotikumgehalt des Nährbodens und damit der Selektionsvorteil fortfällt, kann es sich erweisen, ob tatsächlich der ganze Stamm resistent geworden ist. Tritt ein "Resistenzverlust" auf, so kann das auf ein erneutes Überwiegen der noch nicht abgetöteten sensiblen Anteile der Population zurückzuführen sein; es sind aber experimentell auch echte Rückmutationen nachgewiesen worden. Der ungerichtet Wechsel zwischen "Resistenz" und "Sensibilität", wie wir ihn bei zwei Stämmen in Bezug auf INH beobachtet, wird vorstellbar, wenn wir bedenken, daß bei der spontanen Mutation nicht nur "voll resistente", sondern auch "abgeschwächt empfindliche" oder "mäßig resistente" Keime entstehen, und daß das Verhalten eines Stammes im ganzen durch ein kompliziertes, nur z. T. bereits bekanntes Spiel zwischen "Selektion" und "Kontraselektion" (z. B. Vitalitätsverlust gekoppelt mit Chemoresistenz u. a.) bestimmt wird. Das Erhaltenbleiben der Resistenz als Eigenschaft des ganzen Stammes hat also neben dem durch Mutation entstandenen zahlenmäßigen Überwiegen resistenter Keime zur Voraussetzung, daß im veränderten Milieu, nach dem Wegfall der Selektion durch das Antibiotikum im Nährboden, kein anderer Mechanismus im Sinne einer Kontraselektion zugunsten der etwa noch vorhandenen oder durch Rückmutation entstehenden sensiblen Keime wirkt. Daß andererseits die Sensibilität einer Population bei ständiger Gegenwart des Chemotherapeutikums nur unter besonderen Bedingungen (Stoffwechselruhe der Keime, klin. Kombinationsbehandlung) von Dauer ist, ist aus der experimentellen wie aus der klinischen Praxis wohlbekannt. Nur wo die Gegenauslese durch das Chemotherapeutikum fehlt, bleibt der Stamm sensibel - die spontane Mutationsrate, die in gewissen Grenzen für das jeweilige Chemotherapeutikum spezifisch ist, verändert sich unter "normalen" Bedingungen nicht.

362 Chemoresistenz der TB nach radioaktiver Exposition

Die Prüfung der Chemoresistenz unserer 8 TB-Stämme nach Exposition auf P-32-haltigen Nährböden wurde mit der unter 224 beschriebenen Methode vorgenommen. Da wir nicht die Möglichkeit hatten, die radioaktiven Bakterien zu waschen, wurden die Kolonien zur Herstellung der Aufschwemmungen für die Beimpfung der chemotherapeutikahaltigen Nährböden in den meisten Fällen mit der Öse direkt von den P-32-haltigen Nährböden entnommen, die noch eine gewisse Menge Radioaktivität enthielten. Die Gesamtaktivität der Aufschwemmungen setzte sich demnach aus 2 Anteilen zusammen: dem von den TB während ihres Wachstums aufgenommenen P-32 und dem P-32-Gehalt der Nährbodenteilchen, die den mit der Öse abgenommenen Kolonien noch anhafteten. Die Höhe der Gesamtaktivität der Aufschwemmungen war also sowohl von der P-32-Aufnahmerate des betreffenden TB-Stammes (s. Abb. 332-1, S.51), als auch von der Ausgangs-AK des Nährbodens abhängig (s. Abb. 331-1, S.48). Gemäß dem physikalischen Zerfall des Radiophosphor war sie ferner eine Funktion der Dauer der Exposition der TB auf den P-32-haltigen Nährböden.

Die Expositionsdauer betrug nie weniger als 20 Tage, d. h. also wenigstens 1 1/2 Halbwertzeiten des P-32; in dieser Zeit ist aber selbst die maximale AK unserer Versuchsreihen auf Werte abgesunken, die unterhalb der kritischen Grenze liegen, bei der wir eine Wachstumshemmung unserer Kulturen nachweisen konnten (s. Tab. 32-1, S.44). Dazu kommt, daß infolge der zweimaligen Verdünnung bei der Herstellung der Aufschwemmungen und bei der Aufbringung des Impftropfens auf den Testnährboden die AK = Aktivitäts konzentration ganz erheblich absinkt. Immerhin haben wir zur Kontrolle in einigen Fällen zwischen die radioaktive Expsotion und die Resistenzprüfung eine Subkultur auf Grundnährböden eingeschaltet.

Um einen Anhalt für die Dosisabhängigkeit etwaiger Veränderungen der Chemoresistenz der TB zu gewinnen, führten wir die Resistenzbestimmungen mehrfach, nach verschieden langer Expositionszeit und nach verschieden hoher AK der P-32-haltigen Nährböden durch. Außerdem wurden auch einige Kulturen aus den Doppelröhrchen geprüft, bei denen also wohl eine radioaktive Bestrahlung, aber keine Aufnahme des P-32 durch die TB erfolgt war (s. 2273 S.29 ff. und 315, S.43).

Die Ergebnisse unserer Untersuchungen seien zunächst in Bezug auf die Eigenschaft "sensibel" zusammengestellt. Tab. 362-1 gibt eine Übersicht über die Hemmtiter der vier voll sensiblen Stämme H 37, BCG, Ur und Hä nach P-32-Exposition, Tab. 362-2 über die Hemmtiter der vier sogen. "resistenten" Stämme Ro, Hr, Ho und Bl nach P-32-Exposition für diejenigen Chemotherapeutika, für welche in der Vorbeobachtung eine konstante Empfindlichkeit bestanden hatte (s. Tab. 361-3, S.62). Der Ausfall der Kontrollversuche mit den nicht radioaktiv exponierten Kulturen dieser Stämme läßt sich aus den Tabellen 361-1 und 361-2 unter dem entsprechenden Datum ablesen (gewisse Verschiebungen der Daten sind dadurch bedingt, daß es nicht immer möglich war, die großen Serien von Resistenzbestimmungen auf einmal anzusetzen).

Tab. 362-1

Stamm	Art d. P-32-Exp.			Hemmwert in γ/ml für			
Datum der Ablesung	AK µc/ml	Dauer d	Gef. RPD	SM	PAS	Cont	INH
H 37							
29. 1. 57	50	61	R	5	< 1	< 1	< 0,05
	70	61	R	5	< 1	< 1	< 0,05
	80	61	R	5	< 1	< 1	< 0,05
23. 3. 57	20	27	R	< 1	< 1	< 1	< 0,05
	60	27	R	< 1	< 1	< 1	< 0,05
	100	27	R	< 1	< 1	< 1	< 0,05
26. 7. 57	40	29	R	< 1	< 1	5	0,1(+)
	100	29	R	-	-	-(+)	0,1
BCG							
23. 3. 57	20	27	R	1(+)	1(+)	1(+)	0,1(+)
	60	27	R	1(+)	1(+)	1(+)	0,1(+)
	100	27	R	1(+)	1(+)	1(+)	0,1(+)
	60	27	D	5	1(+)	1(+)	0,1
	100	27	D	5	1(+)	1(+)	0,1
Ur							
26. 7. 57	40	29	R	< 1	< 1	< 1	0,1
	100	29	R	< 1	< 1	< 1	0,1
Hä							
23. 3. 57	60	27	R	5	< 1	1(+)	0,05(+)
	100	27	R	5	< 1	< 1	0,05

Hemmtiter der sensiblen TB-Stämme H 37, BCG, Ur und Hä nach Exposition auf P-32-haltigen Nährböden.

(d = Tage; Gef. = Gefäß: R = Reagenzglas, P = Petrischale, D = Doppelröhrchen)

Tab. 362-2

Stamm / Datum der Ablesung	Art d. AK µc/ml	P-32-Exp. Dauer d	Gef. RPD	SM	Hemmwert in γ/ml für PAS	Cont	INH
Ro							
29. 1. 57	40	61	R			< 1	
	50	61	R			< 1	
	80	61	R			< 1	
	40	38	R	... zwischen radioaktiver Exposition und Resistenzprüfung 23 Tage Subkultur auf P-32-freien Grundnährböden		< 1	
	50	38	R			< 1	
	60	38	R			< 1	
	70	38	R			< 1	
	80	38	R			< 1	
22. 3. 57	20	25	R			< 1	
	60	25	R			< 1	
	80	25	R			< 1	
	100	25	R			< 1	
	20	25	D			1(+)	
	60	25	D			1(+)	
	100	25	D			5(+)	
26. 7. 57	40	29	R	. . . Ro/r 50 PAS ...		< 1	
	100	29	R			< 1	
23. 8. 57	40	53	R	. . . Ro/r 50 PAS ...		< 1	
	100	53	R			< 1	
Hr							
22. 3. 57	20	25	R			1	
	60	25	R			5(+)	
	100	25	R			1(+)	
Ho							
22. 3. 57	20	25	R		< 1	5(+)	
	60	25	R		< 1	5(+)	
	100	25	R		< 1	5(+)	
26. 7. 57	80	29	R		< 1	< 1	
Bl							
23. 3. 57	20	27	R		< 1	< 1	
	60	27	R		< 1	< 1	
	100	27	R		< 1	5	
26. 7. 57	40	29	R	. Bl/r 10 SM	< 1	< 1	
	100	29	R		< 1	< 1	
	40	29	R	. Bl/r 50 INH	< 1	< 1	
	100	29	R		< 1	< 1	

PAS- und bzw. oder Cont-Hemmtiter der TB-Stämme Ro, Hr, Ho und Bl nach Exposition auf P-32-haltigen Nährböden.

(d = Tage; Gef. = Gefäß: R = Reagenzglas, P = Petrischale, D = Doppelröhrchen)

Wie aus den voranstehenden Tabellen zu entnehmen ist, ergaben die Resistenzbestimmungen nach P-32-Exposition der getesteten TB-Stämme, daß ihre Chemosensibilität, die sich bei allen auf Conteben, bei H 37, BCG, Ur, Hä, Ho und Bl auch auf PAS und bei H 37, BCG, Ur und Hä außerdem auf SM und INH erstreckte, durch die vorherige Einwirkung von P-32 bis zu einer maximalen AK von 100 µc/ml Nährboden und bis zu einer Expositionsdauer von 61 Tagen nicht verändert wurde. Die der Chemosensibilität zugrunde liegenden biochemischen Reaktionen bzw. die diese Reaktionen steuernden "Gene" waren also im gegebenen Aktivitätsbereich stabil. Da der Mechanismus der Resistenzentwicklung für die vier untersuchten Chemotherapeutika entsprechen ihrer unterschiedlichen Wirkungsweise verschieden ist, ist hier also anscheinend ein ganzer Komplex von Erbstrukturen gegen Dosen von P-32 unempfindlich, die immerhin bei einigen Stämmen zur Wachstumshemmung führen. Dies ist umso bemerkenswerter, als es ja experimentell in vitro durchaus gelingt, einen sensiblen TB-Stamm gegen steigende Dosen eines Chemotherapeutikums durch Selektion resistent zu machen, indem man die aus einer resistenten Spontanmutante in Gegenwart des Chemotherapeutikums gewachsenen Kolonien in Gegenwart dieser chemischen Verbindung weiterzüchtet. Unsere Untersuchungen zeigten demnach zweierlei:

1. Die Exposition auf P-32-haltigen Nährböden der gegebenen AK führte bei acht untersuchten TB-Stämmen in keinem Falle zu einer Veränderung der Mutationsrate ihrer Chemo r e s i s t e n z, obwohl bei einigen dieser Stämme in dem gleichen AK-Bereich eine dosisabhängige Wachstumshemmung beobachtet werden konnte.

2. Der P-32-Gehalt der radioaktiven Nährböden ergab offenbar keinen Selektionsvorteil für die in Höhe der spontanen Mutationsrate auftretenden resistenten Individuen der bei den Resistenzprüfungen untersuchten Populationen, obwohl in einer anderen Versuchsreihe ein gewisser Unterschied der getesteten Stämme in Bezug auf die Phosphor a u f n a h m e nachgewiesen werden konnte.

Die Zusammenstellung unserer Versuchsergebnisse in Bezug auf die Eigenschaft "resistent" zeigt demgegenüber ein anderes Bild. Bei wiederholter Prüfung hatten sich als konstant resistent erwiesen (s. Tab. 361-3):

der Stamm Ro gegen PAS
der Stamm Hr gegen PAS, INH, SM
der Stamm Bl gegen INH.

Wir führen in Tab. 362-3 die beim Stamm Ro erhobenen Befunde auf, geordnet in zwei Gruppen nach den Aktivitätskonzentrationen O (= Kontrollen) bis 50 µc/ml Nährsubstrat und 60 bis 100 µc/ml Nährsubstrat.

Tab. 362-3

Datum der Ablesung	Art d. AK µc/ml	P-32-Exp. Dauer d	Hemmwert für PAS in γ/ml	Wachstum bei 50 γ/ml PAS	
3. 8. 56	0	22	> 50	+	
29. 1. 57	40	61	> 50	+	
	50	61	> 50	+	
22. 3. 57	0	25	> 50	+	
	20	25	> 50	+	
23. 4. 57	0	61	> 50	+	
4. 6. 57	0	22	> 50	+	
26. 7. 57	0	29	> 50	+	
	40	29	> 50	+	
23. 8. 57	0	53	> 50	+	
	40	53	> 50	+	11/11
29. 1. 57	80	61	5	ø	
22. 3. 57	60	25	10(+)	ø	
	80	25	10(+)	ø	
	100	25	10	ø	
23. 4. 57	100	61	< 1	ø	
26. 7. 57	100	29	5(+)	ø	
23. 8. 57	100	53	10(+)	ø	0/7

PAS-Hemmtiter des TB-Stammes Ro nach Exposition auf P-32-haltigen Nährböden in Reagenzgläsern.

(AK = Aktivitätskonzentration; d = Tage)

Bereits auf den ersten Blick läßt sich aus der Tabelle entnehmen, daß die hohen PAS-Hemmwerte des Stammes Ro nach Exposition auf P-32-haltigem Nährboden mit einer AK von 60 bis 100 µc/ml erheblich absanken, während sie nach Exposition auf nicht aktiven Nährböden und auf Nährböden mit einer AK bis 50 µc/ml auch bei langer Dauer der Exposition bis zu 61 Tagen unverändert hoch blieben. Mit anderen Worten: Unter der Einwirkung von 60 bis 100 µc/ml P-32 im Nährboden kam es zum Phänomen der "Resensibilisierung" der Kulturen. Die statistische Auswertung der Befunde erfolgte nach dem χ^2-Verfahren unter Benutzung der Korrektur von Yates zur Berücksichtigung kleiner Zahlen. Die Überschreitungswahrscheinlichkeit liegt unter 0,01, d.h. das Ergebnis ist statistisch gesichert.

Bei dem ebenfalls gegen PAS (und zugleich gegen SM und INH) resistenten Stamm Hr konnte der Einfluß der Exposition auf P-32-haltigen Nährböden auf die Hemmtiter für PAS, SM und INH leider nur einmal geprüft werden, das Ergebnis ist daher statistisch nicht zu verwerten. Im Zusammenhang mit den beschriebenen Befunden bei Ro verdient es aber doch eine gewisse Beachtung, daß auch hier bei einer AK von 100 µc/ml der Hemmtiter für PAS absank, die Kolonien also "sensibler" erschienen als die nicht auf P-32-haltigen Nährböden exponierten Kontrollen.

Der bei Aktivitätskonzentrationen von 60 bis 100 µc/ml Nährboden reproduzierbare "Sensibilitätseffekt" blieb bei Ro unter zwei ganz verschiedenen Veränderungen der Versuchsbedingungen aus: nämlich dann, wenn nach der Exposition auf den radioaktiven Nährböden bzw. vor der Resistenzprüfung eine Subkultur auf P-32- und chemotherapeutikafreien Grundnährböden zwischengeschaltet wurde, und ebenso, wenn die P-32-Expostion der Kulturen nicht im üblichen Reagenzglas, sondern im Doppelröhrchen erfolgt war. Der Versuch mit zwischengeschalteter Subkultur (23 Tage nach vorangegangener radioaktiver Exposition von 38 Tagen) wurde bei Aktivitätskonzentrationen von 60, 70 und 80 µc/ml 6 mal durchgeführt, der Doppelröhrchenversuch bei Aktivitätskonzentrationen von 60 und 100 µc/ml 4 mal. Die Ergebnisse konnten nach dem χ^2-Verfahren unter Benutzung der Korrektor von Yates zur Berücksichtigung kleiner Zahlen statistisch gesichert werden: die Überschreitungswahrscheinlichkeit lag unter 0,01. Die mögliche Bedeutung dieser Befunde für die Frage der mutagenen Wirkung des P-32 soll im Rahmen der zusammenhängenden Diskussion unserer Untersuchungen erörtert werden (s. unter 4).

Die Prüfung der INH-Resistenz des Stammes Bl nach Exposition auf P-32-haltigen Nährböden ergab bei 9 Versuchen (18 Einzelproben) mit Aktivitätskonzentrationen von 20 bis 100 µc/ml (davon 5 mal 60 bis 100 µc/ml) in keinem Falle eine Veränderung des Hemmtiters, der wie bei den nicht radioaktiv exponierten Kontrollen (6 mal untersucht mit 12 Einzelproben) 50 γ/ml betrug. Auch der ebenso hohe INH-Hemmtiter des mehrfach resistenten Stammes Hr erwies sich bei allerdings nur 3 Versuchen (6 Einzelproben) mit Aktivitätskonzentrationen der P-32-haltigen Nährböden von 20, 60 und 100 µc/ml als unbeeinflußt. Die Ergebnisse stehen mit der Unveränderlichkeit der Katalase-Reaktion vor und nach Exposition auf unseren radioaktiven Nährböden in Einklang (s. unter 35, S. 57) und sollen zur besseren Übersicht in der folgenden Tabelle 362-4 nochmals zusammengefaßt werden.

Tab. 362-4

Datum der Ablesung	Art d. AK µc/ml	P. 32-Exp. Dauer d	Hemmwert für INH γ/ml	Wachstum bei 50 γ/ml INH	Katalase-Reaktion
Bl					
5. 12. 56	0	21	>50	+	ø
22. 3. 57	0	27	>50	+	ø
	20	27	>50	+	-
15. 4. 57	0	54	>50	+	ø
	20	54	50(+)	+	-
15. 5. 57	0				ø
2. 7. 57	0	21	>50	+	-
26. 7. 57	0	21	50(+)	+	-
	0	29	50(+)	+	-
	40	29	>50	+	ø
	40	29	>50	+	ø
23. 3. 57	60	27	>50	+	-
	100	27	>50	+	-
15. 4. 57	100	54	50(+)	+	-
26. 7. 57	100	29	>50	+	ø
	100	29	>50	+	ø
Hr					
22. 11. 56	0	21	>50	+	ø
22. 3. 57	0	27	>50	+	-
	20	25	>50	+	ø
4. 6. 57	0	21	>50	+	ø
22. 3. 57	60	25	>50	+	ø
	100	25	>50	+	ø

INH-Hemmtiter der Stämme Bl und Hr nach Exposition auf P-32- haltigen Nährböden in Reagenzgläsern, Katalase-Reaktion unter den gleichen Bedingungen.

(AK = Aktivitätskonzentration; d = Tage)

Das Verhalten der Streptomycinresistenz des mehrfach resistenten Stammes Hr nach Exposition auf P-32-haltigen Nährböden wurde nicht geprüft.

4 Besprechung der Untersuchungsergebnisse

Das Ziel der im vorigen Kapitel 3 beschriebenen Untersuchungen war, einen kleinen Beitrag zur Strahlenbiologie zu liefern, welche sich ja noch sehr stark in der Phase des Materialsammelns befindet. Wie die Zusammenstellung von R. W. Kaplan in der von Schinz, Holthusen u.a. herausgegebenen Monographiesammlung über die Ergebnisse der Strahlenbiologie, Strahlentherapie usw. von 1952 bis 1958 (Thieme 1959) zeigt, sind inzwischen für Abtötungs- und Mutationsversuche im Bereich der Strahlengenetik der Mikroorganismen bestimmte Standardmethoden herausgearbeitet worde, wobei auf biologischer Seite neben Pilzen (Neurospora, Aspergillus, Hefen), Protozoen (Paramaecium), niederen Algen (Chlamydomonas) unter den Bakterien vor allem Bact. coli (K 12 u.a.), Salmonella, Nocardia, Serratia und verschiedene Streptomycesarten (seltener B. subtilis oder Staph. aureus) - auf physikalischer Seite fast ausschließlich Röntgenstrahlen und UV-Licht verwendet werden.

Künstliche radioaktive Isotpe, die der Nährlösung zugesetzt und daraus von den Bakterien aufgenommen werden konnten, dienten zunächst in erster Linie als "Indikatoren" (J.O. Ely 1941/42, O.A. Ross 1942, Ström und Mitarb. 1949 und 1951, Spiess und Poppe 1954 - s. 1, S. 11 ff.) und wurden erst später, als sich die metabolisch bedingte Unzuverlässigkeit einer derartigen Markierung lebender Zellen erwies, mehr und mehr zu Stoffwechseluntersuchungen bei den Mikroorganismen herangezogen (J. Meissner 1956). Die dabei u.a. gewonnenen Erkenntnisse über die Stabilität des Einbaus einzelner (radioaktiver) Elemente oder ihrer Verbindungen in die Leibessubstanz verschiedener Bakterienarten ergaben neuerlich gewisse Möglichkeiten, radioaktive Isotope als "intravitale Tracer" anzuwenden (J. Meissner 1956, Labaw und Mitarb., D. Koch-Weser 1956 - s. 1, S. 14).

Ein wesentliches Anliegen bei Bakterienstoffwechseluntersuchungen ist die Klärung der Wirkungsweise chemischer Mittel bei pathogenen Keimen. Arbeiten, die sich damit befassen, benutzen radioaktive Isotope, um die jeweilige antibiotische chemische Verbindung zu signieren und sie entweder im Makro- oder im Mikroorganismus zu verfolgen (Unverricht, W. A. Koehn, H. Oeser, K. Schattmann und H. G. Mehl 1956, s. 313, S. 38), wobei nun auch der TB mit seinen vielfältigen chemotherapeutischen Problemen in den Kreis des Interesses rückt (D. Koch-Weser 1956, A. Heller, R. H. Ebert, D. Koch-Weser und Lloyd J. Roth 1957). Das entscheidende der hier in Betracht kommenden Probleme ist die Resistenzentwicklung, die mit ihrem Wechselspiel zwischen Mutations- und Selektionsvorgängen die Verbindung zwischen Stoffwechsel und Genetik herstellt, so daß es lohnend erscheint, die mutagene Wirkung der bei Bakterienstoffwechselarbeiten gebräuchlichen radioaktiven Isotope zu untersuchen. Für P-32 ist dies u.a. 1958 durch F. Kaudewitz, W. Vielmetter und H. Friedrich-Freksa bei Escherichia coli geschehen.

Dagegen ist der hier in Rede stehende Fragenkomplex über die Wirkung von P-32 im Nährboden auf Wachstum, Stoffwechsel und Chemoresistenz von TB unseres Wissens nur von J. Meissner und Mitarb. (s. 1, 16/17) unter dem Gesichtspunkt der Phosphataufnahme (aus flüssigen synthetischen Nährmedien) und ihrer Beziehung zur Granulabildung, also im Sinne einer Stoffwechseluntersuchung geprüft worden.

Wir werden sehen, ob sich die von uns gewonnenen Ergebnisse in das bisher aufgebaute Gerüst einfügen lassen.

Was zunächst unsere Wachstumsversuche betrifft (s. 32 und Tab. 32-1, S. 44), so fanden sich orientierende zahlenmäßige Hinweise bei Spiess und Poppe, die bei 10 - 30 µc/ml flüssigen Nährmediums ebensowenig eine Wachstumshemmung sahen, wie J. Meissner und Kropp bei 0,35 µc/ml, während Bonét- Maury und Mitarb. (zit. bei J. Meissner) 200 µc/ml Nährlösung als kritische P-32-Konzentration für TB angeben - oberhalb davon könne kein Wachstum mehr stattfinden.

Bei unseren eigenen Untersuchungen an 8 TB-Stämmen auf festen Nährböden liegt die untere Grenze der Wachstumshemmung bei 40 µc/ml, wir haben jedoch die obere Grenze, d. h. ein vollständiges Sistieren des Wachstums bei allen 8 Stämmen, mit der in unseren Versuchen angewandten maximalen AK von 100 µc/ml Nährboden noch nicht erfaßt. Da wir aus technischen Gründen nicht quantitativ kulturell arbeiten konnten, ist eine exakte Berechnung der Dosiswirkungskurve, etwa in Form der "Schädigungs"- oder "Überlebenskurve" (Sommermeyer) für die in unserem Dosisbereich geschädigten TB-Stämme nicht möglich. Auffällig erscheint uns aber, daß innerhalb dieses nur mäßig breiten Dosisbereiches doch erhebliche Unterschiede in der "Empfindlichkeit" unserer TB-Stämme bestehen: während einige gar nicht beeinträchtigt werden, tritt bei einem Stamm (Hä) schon bei 40 µc/ml eine Wachstumshemmung auf, d. h. bei einer AK, die nur wenig über den von Spiess und Poppe zu Markierungszwecken angewandten Dosen liegt. Ein Hinweis für das Verständnis einer solchen "Differenz der Strahlenempfindlichkeit" scheint uns in dem Ergebnis des Doppelröhrchenversuches enthalten, daß der wachstumshemmende Effekt des P-32 auch bei den "strahlensensiblen" TB-Stämmen ausbleibt, wenn das radioaktive Element von den TB nicht aufgenommen werden kann bzw. wenn die Qualität der Strahlung infolge des Durchgangs durch eine Glasschicht verändert ist.

Die von uns durchgeführten Untersuchungen über die Aufnahme von P-32 aus dem Nährboden durch unsere 8 TB-Stämme bestätigten mit etwas gröberer Methodik die von J. Meissner und Mitarb. bereits gefundene Tatsache, daß TB-Kolonien einen bestimmten Phosphatbedarf durch Aufnahme aus dem Nährmedium decken und ließen andeutungsweise erkennen, daß die Phosphataufnahme bei verschiedenen TB-Stämmen unterschiedlich groß ist. Die genannten Autoren beobachteten eine positive Korrelation zwischen der (z. B. durch Nährbodenvariation provozierbaren) Granulabildung und der Phosphataufnahme der TB, während der Vergleich der Phosphataufnahme eines H 37- und eines BCG-Stammes kein eindeutiges Ergebnis lieferte.

Wir konnten bei der relativ kleinen Zahl unserer Versuche mit einer ziemlich groben Methodik einen Zusammenhang zwischen der P-32-Aufnahme eines Stammes und seiner "P-32-Empfindlichkeit" in Bezug auf das Wachstum nicht sichern. Auf Grund der von uns gewonnenen orientierenden P-32-Aufnahmekurven der untersuchten Stämme möchten wir aber meinen, daß es sich lohnen würde, mit adäquater Methodik dieser Frage noch einmal nachzugehen. Ihre Beantwortung würde uns der Antwort auf die Frage nach der eigentlichen Ursache der Wachstumshemmung der TB in Gegenwart von P-32 näherbringen. Wenn es sich z. B. um eine sogen. Letalmutation handelte, müßte der Effekt entsprechend der Treffertheorie im Bereich der ionisierenden Strahlung in Abhängigkeit von der Dosis, aber unabhängig von der Inkorporierung des P-32 durch die TB und unabhängig vom Spektrum der Strahlung auftreten - in unserem Falle also auch im Doppelröhrchenversuch. Kaplan berichtet in seiner Monographie 1959 über eine Anzahl von Arbeiten verschiedener Autoren, deren Ergebnisse gegen die zunächst wegen vieler Ähnlichkeiten aufgestellte Hypothese sprechen, daß Tötung und Mutation durch Strahlen wesensgleich seien und daß "die Tötung letztlich auf Letalmutationen beruhe". Er kommt zu dem Schluß, daß ein größerer Teil der Zelltötungen durch Strahlen wohl in einer "nicht genetischen Kerninaktivierung unbekannter Natur" bestehe. Es scheint uns möglich, unsere Befunde über das TB-Wachstum in Gegenwart von P-32 an dieser Stelle einzuordnen: wenn nämlich die letale Wirkung des P-32 auf die TB mit dem Phosphataufnahmequotienten und mit der Granulabildung der TB korreliert ist. Sieht man die "Granula", oder wenigstens einen bestimmten, optisch definierbaren Typ dieser Gebilde (s. 1 S. 16) als "Kernäquivalente" der TB an, so ist damit die Verbindung zu der oben zitierten Formulierung Kaplans über die Zelltötung durch Strahlen hergestellt. Auf der anderen Seite finden wir Anschluß an eine Veröffentlichung von Stent und Fuerst (1957), die nachgewiesen haben, daß Kerninaktivierung nach P-32-Einbau bei E. coli nur dann auftritt, wenn sich der radioaktive Phosphor in der DNS der Zelle befindet. 1958 zeigten dann Kaudewitz, Vielmetter und Friedrich- Freksa mit Hilfe einer gegen ionisierende Strahlen und UV unempfindlichen Mutante eines Coli-Stammes, daß sowohl die kern-inaktivierende (abtötende) als auch die mutative Wirkung von P-32-Atomen nach deren Einbau in die lebende Substanz der Bakterienzellen nicht eine Folge der ionisierenden ß-Strahlung ist, sondern durch die Umwandlung der P-32- in S-32-Atome und die beim Zerfall auftretenden Compton-Rückstöße hervorgerufen wird. In Analogie zu den Untersuchungen von Stent und Fuerst schließen die Verfasser aus der übereinstimmenden Kinetik, daß für beide Effekte der Einbau des P-32 in die zelluläre DNS die Voraussetzung ist.

Diese letztgenannten Ergebnisse scheinen in einem gewissen Gegensatz zu der Erklärung Kaplans zu stehen, daß "es nicht möglich ist, durch Untersuchung der experimentell leicht faßbaren Tötung etwas Sicheres über den Mutationsprozeß zu lernen". Eine weitere Klärung dieses Fragenkomplexes scheint uns in Bezug auf Tuberkelbakterien in zweierlei Richtung möglich: durch Einbeziehung weiterer Stämme mit

mit bekanntem Phosphataufnahmequotienten in die Untersuchungen und durch Behandlung der Kulturen mit anderen ionisierenden Strahlen, z. B. Röntgenstrahlen.

Beim Studium der mutagenen Wirkung ionisierender Strahlen in der Mikrobiologie kann man sich zum Nachweis physiologischer Mutanten z. B. ausgewählter Nährböden bedienen: auf Indikatornährböden lassen sich bestimmte biochemische Veränderungen in Form von Farbabweichungen erkennen, mit Hilfe von Komplett- oder Minimalnährböden ist es möglich, "auxotrophe" von "prototrophen" (oder "anauxotrophen") Varianten zu unterscheiden. Da wir bei unserer Arbeit aus technischen Gründen versuchen mußten, mit bakteriologischen Routinemethoden auszukommen, haben wir die etwaige mutagene Wirkung des P-32 zunächst an einer sehr einfachen Reaktion geprüft: an der sogen. Katalase-Aktivität der TB (s. 35, S. 57-58). Maßgebend für die Wahl dieser Reaktion war einmal, daß das normalerweise von TB wie von anderen aeroben Bakterien produzierte, H_2O_2 in molekularen Sauerstoff und Wasser spaltende Enzym Katalase der Größenordnung nach in den Bereich der "Treffer-Rezeptoren" gehört (1, S. 9) - zum anderen, daß nach den inzwischen vielfach bestätigten Beobachtungen von G. Middlebrook (1954) der Katalase-Verlust bei TB gekoppelt ist mit INH-Resistenz. Die Tatsache, daß diese Kombination beim Phänotyp konstant ist, daß also keine Bestardisierung oder Rekombination auftritt, spricht gegen das Zugrundeliegen etwa mehrerer Genmutationen oder eines Chromosomenumbaus. Vielmehr ist zu vermuten, daß beide Erscheinungen auf eine einzige Genveränderung zurückzuführen sind oder daß die eine (INH-Resistenz) der anderen (Katalase-Verlust) nachgeordnet ist.

Unsere Versuche über die mutagene Wirkung des P-32 in Bezug auf Katalasegehalt und INH - Empfindlichkeit der TB fielen negativ aus (s. Tabelle 35-1, S.58 -Tabelle 362-1, S.65 und Tabelle 362-4, S. 70): weder wurden die INH-sensiblen und Katalasepositiven TB-Stämme nach P-32-Exposition INH-resistent und Katalase-negativ, was einer Erhöhung der Rate der spontanen Mutation zur INH-Resistenz entsprochen hätte, noch trat das Umgekehrte ein. Vor allem aber kam es auch nach P-32-Exposition im gegebenen Dosisbereich nicht zu einer "Dissoziation" der beiden gekoppelten Phänotypen INH-resistent/Katalase-negativ und INH-sensibel/Katalase-positiv. Vielleicht würde es sich lohnen, diese Untersuchungen z. B. mit UV- oder Röntgenstrahlen fortzusetzen.

Der Katalase-Gehalt der bestrahlten TB ist noch unter einem anderen Gesichtspunkt interessant, nämlich dem des sogen. "Sauerstoffeffektes", der sowohl bei höheren Organismen, als auch bei Mikroben festzustellen ist: eine z. T. erhebliche Verstärkung der biologischen (mutagenen und letalen) Wirkung ionisierender Strahlen durch O_2 bzw. die Verminderung dieser Wirkung in Abwesenheit von O_2, die z. B. durch eine Reihe von reduzierenden sogen. "Schutzsubstanzen" erreicht werden kann. Zur Erklärung für den O_2-Effekt dient die sogen. "Wasseraktivierungsphypothese", wonach die bei der Spaltung des Wassers durch die ionisierenden Strahlen in Gegenwart von O_2 verstärkt entstehenden Radikale OH und HO_2 sowie die sehr reaktionsfähigen

Produkte H_2O_2 und H_2 als "Hauptinitiatoren der radiobiologischen Effekte in wasserhaltigen Zellen" (Kaplan) aufzufassen sind. Kaplan möchte "die Wirkung des O_2-Entzuges und der Schutzstoffe in der spezifischen Modifikation der Struktur des Treffbereichs" sehen, die "zu einer Senkung der Strahlenempfindlichkeit dieser Strukturen führt". Offenbar wird die "Mutabilität wenigstens zu einem Teil durch Bildung intracellulärer Peroxyde verursacht" und möglicherweise "die Mutation in vielen Fällen durch Oxydation (der DNS?) eingeleitet" (Kaplan) In diesem Sinne könnten die Befunde der Arbeitsgruppe Haas, Wyss, Stone u.a. gedeutet werden, daß katalasereiche Baktereienstämme schwächer spontan mutieren als katalasearme, und daß Katalase im Medium die Mutabilität bei direkter UV-Bestrahlung vermindert.

Betrachten wir die Daten der Tabellen 32-1, S.44 und 35-1, S. 58 daraufhin, so lassen sich Katalasepositivität und unbehindertes Wachstum ("Strahlenunempfindlichkeit") bei H 37 und BCG ebenso wie Katalasenegativität und Wachstumshemmung ("Strahlenempfindlichkeit") bei Ro und Hr mit der dargestellten Hypothese in Einklang bringen, während die Ergebnisse bei Hä (katalasepositiv bei Wachstumshemmung) und bei Bl (katalasenegativ bei ungestörtem Wachstum) nicht in das Schema zu passen scheinen.

Der besseren Übersicht wegen sei hier in die Erörterung noch einmal eine Tabelle eingeschaltet, in der 7 von unseren 8 TB-Stämmen in Hinsicht auf die drei Eigenschaften Katalase (s. Tab. 35-1, S. 58), Verhalten gegen SM, PAS, Cont, INH (s. Tab. 361-3, S.62 und Wachstum in Gegenwart von P-32 ("Hemmwert" = AK in uc/ml Nährboden, s. Tab. 32-1, S. 44) zusammengestellt sind.

Tab. 4-1

Stamm	Katalase	Verhalten gegen				Wachstumshemmung durch P-32 bei AK in µc/ml
		SM	PAS	Cont	INH	
H 37	+++	s	s	s	s	100
BCG	++	s	s	s	s	100
Hä	+++	s	s	s	s	40 - 60
Ro	ø	-	r	s	-	50 - 60
Hr	ø	r	r	s	r	80
Ho	ø	-	s	s	-	100
Bl	ø	-	s	s	r	100

s = sensibel
r = sesistent

Die Tatsache, daß sich bereits in unserem ersten Versuch (s. 311 und Abb. 311-1, S. 34/35) über das Wachstum von TB in Gegenwart von P-32 im Nährboden ein unterschiedliches Verhalten der beiden geprüften Stämme zeigte, ist einem Zufall zu danken, denn wenn nicht der Standard-Labor-Stamm H 37 Rv, so war doch wenigstens der diesem gegenübergestellte Patientenstamm "Ro" willkürlich (wegen seines gleichmäßig üppigen Wachstums!) aus dem Material herausgegriffen, welches im MUA III auf Grund der hier routinemäßig für die Tuberkulose-Abteilungen der Städt. Krankenhäuser in Schöneberg und Tempelhof durchgeführten Resistenzbestimmungen zur Verfügung stand. Auf diese Weise waren allerdings die Probandenstämme von vornherein durch ihre Chemoresistenz bzw. -sensibilität charakterisiert, die daher umso eher als mögliche Kriterien der Wirkung von P-32 auf TB in unsere Untersuchungen mit einbezogen wurden, als eben die beiden ersten, in Bezug auf das Wachstum verschieden stark "strahlenempfindlichen" Teststämme auch in ihrer Chemosensibilität (für PAS) deutlich voneinander abwichen.

Die weiteren Versuche unter Heranziehung neuer, teils chemosensibler, teils gegen einen oder mehrere der genannten Chemotherapeutika resistenter TB-Stämme ergaben, wie aus Tab. 4-1 (S.75) hervorgeht, keinen gesetzmäßigen Zusammenhang - weder im Sinne einer positiven Korrelation zwischen einem bestimmten Chemoresistenzmuster und der "Strahlenempfindlichkeit" eines Stammes, noch etwa eindeutig in Form einer verminderten Strahlenempfindlichkeit bei den chemosensiblen Stämmen. Zwar erwiesen sich die PAS-resistenten Stämme Ro und Hr im Wachstumsversuch als strahlenempfindlich - doch gilt das gleiche für den voll sensiblen Stamm Hä, der damit umgekehrt auch eine Ausnahme von der für die anderen Stämme geltenden Beobachtung macht, daß Empfindlichkeit gegen PAS mit herabgesetzter P-32-Empfindlichkeit einhergeht.

Durch den einfachen Tötungsversuch ist demnach in den Mechanismus der Chemoresistenz, etwa durch Abgrenzung eines elektiven Wirkungsspektrums, kein Einblick zu gewinnen. Dagegen schien es aussichtsreich, die mutagene Wirkung des P-32-am Auftreten der Chemoresistenz nachzuweisen, da ihre Entwicklung auf spontaner Mutation mit folgender Selektion beruht, d. h. die "Mutabilität" des betreffenden, die biochemische Reaktionskette bis zum Erscheinen der Resistenz in Bewegung setzenden Gen-locus gesichert ist. Wir konnten demnach bei den sensiblen Stämmen nach Exposition gegen P-32 eine Erhöhung der Mutationsrate zur Chemoresistenz erwarten, da die Phänotypen der strahleninduzierten Mutanten qualitativ den spontan entstehenden entsprechen.

Wie wir schon mitgeteilt haben (s. 362, Tab. 362-1 und 362-2, S.64/66) wurden wir durch die Versuchsergebnisse in allen Fällen in unserer Erwartung enttäuscht, d. h. die betreffenden Gene oder Gen-loci erwiesen sich im geprüften P-32-Dosisbereich als "stabil".

Vielleicht haben wir es hierbei mit dem negativen Aspekt der sogen. "elektiven Mutabilität" zu tun, deren Vorkommen nach Kaplan als gesichert gelten muß. Welche der beiden grundsätzlichen Arten, ob

die "stamm- oder typenspezifische" oder die "intrazelluläre" Elektivität der Mutationsauslösung in unseren Fällen vorliegt, könnte nur durch weitere Untersuchungen geklärt werden. Handelt es sich um die erste, so müßten bei Prüfung weiterer TB-Stämme auch solche gefunden werden, bei denen eine Erhöhung der Mutationsrate nach Exposition auf P-32-Nährböden auftritt; es gibt allerdings Mutantenstämme, bei denen die typenspezifische Elektivität darin besteht, daß sie zwar spontan mutieren, dagegen auf verschiedene künstliche Mutagene (chemische Stoffe oder Strahlen) nicht reagieren.

Die Behandlung unserer in Bezug auf die Chemoresistenz "P-32-stabilen" TB-Stämme mit anderen Mutativa, z. B. mit Röntgen- oder UV-Strahlen wäre im übrigen geeignet, eine etwaige "intrazelluläre" Elektivität der Mutationsauslösung aufzudecken, welche nach Kaplan "Ausdruck der spezifisch unterschiedlichen Struktur der Gene oder deren naher Umgebung in derselben Zelle sein muß" und "vielleicht einen Weg eröffnet, um der chemischen Individualität der Genstruktur näher zu kommen". Wäre bei unseren "P-32-stabilen" TB-Stämmen also etwa durch UV eine Erhöhung der Mutationsrate zur Chemoresistenz zu erzielen, so würde sich möglicherweise mit den Methoden der Genetik eine genauere Kenntnis von der Biochemie der Resistenzentwicklung erarbeiten lassen.

Es bleibt uns noch das in Tab. 362-3 (S. 68) dargestellte Ergebnis daraufhin zu prüfen, ob das bei den PAS-resistenten Stämmen Ro (und Hr) nach Exposition auf P-32-haltigen Nährböden in Abhängigkeit von der AK aufgetretene Phänomen der "Resensibilisierung" eine mutagene Wirkung des P-32 ist oder nicht. Wir haben bereits berichtet, daß die Erscheinung dann nicht nachzuweisen ist, wenn zwischen P-32-Exposition und Resistenzbestimmung eine Subkultur auf P-32-freien Nährböden eingeschaltet wird oder wenn die Bestrahlung in Doppelröhrchen ohne P-32-Inkorporation durch die TB stattfand. Daraus könnte man schließen, daß es sich bei dieser "Resensibilisierung" nicht um eine echte Rückmutation handelt, die ja einerseits erbfest und durch eine zwischengeschaltete Subkultur nicht beeinflußbar sein dürfte, die andererseits auch ohne Inkorporation des P-32 durch die TB lediglich infolge der ionisierenden Bestrahlung und unabhängig von der Qualität dieser Strahlung in den Doppelröhrchen auftreten müßte. Es bleibt dann zu vermuten, daß die Exposition der Kulturen auf P-32-haltigen Nährböden einen so entscheidenden Selektionsvorteil für die (noch vorhandenen oder durch Rückmutation vereinzelt entstehenden) sensiblen Anteile der Population bedeutet, daß sie auch bei der anschließenden Resistenzprüfung in Gegenwart von PAS, also unter den Bedingungen der Kontraselektion, überwiegen und das Verhalten der Population bestimmen. Diese Hypothese ließe sich mit dem allerdings durch Nachprüfung mit adäquater Methodik noch zu sichernden Ergebnis der Versuche über das Wachstum und die P-32-Aufnahme unserer TB-Stämme stützen (s. unter 32 mit Tab. 32-1, S.44 und unter 332 mit Abb. 332-1, S.50 ff.), daß der PAS-resistente Stamm Ro mehr P-32 aus dem Nährboden aufnahm und im Wachstum auf P-32-haltigen Nährböden deutlich gehemmt war, während der chemosensible Stamm H 37 bei geringerer P-32-Aufnahme aus dem Nährboden in Gegenwart von

P-32 bis zu 100 µc/ml Nährboden keine Beeinträchtigung seines Wachstums zeigte: vielleicht gilt dieser beim Vergleich verschiedener TB-Stämme beobachtete Unterschied der PAS-Aufnahme und des Wachstums analog auch für die PAS-resistenten und PAS-sensiblen Anteile der Population eines Stammes.

Ein gewisser Widerspruch zu dieser Erklärung ergibt sich aus dem Verhalten des mehrfach resistenten Stammes Hr, bei dem nach P-32-Exposition ein Hemmtiterabfall für PAS, aber keine Veränderung der INH-Resistenz und Katalasenegativität auftrat. Wenn hier ein Selektionsvorteil im oben beschriebenen Sinne nur für die PAS-empfindlichen, nicht aber für die INH-empfindlichen Anteile der Population die Ursache der "Resensibilisierung für PAS" wäre, so würde das bedeuten, daß sich die Kulturen aus PAS-resistenten und INH-resistenten Kolonien zusammensetzten, daß sich aber PAS- und INH-Resistenz beim Einzelindividuum ausschlössen.

Beruht dagegen die Mehrfachresistenz des Stammes Hr auf einer Resistenz der einzelnen TB-Individuen sowohl gegen PAS als auch gegen INH, so kann die Tatsache, daß sich die beiden Resistenzeigenschaften nach einer radioaktiven Exposition unterschiedlich verhalten, nur so gedeutet werden, daß es sich bei der Resensibilisierung um eine echte Rückmutation handelt, wobei in unserem Falle der Genlocus "PAS-Resistenz" strahlenempfindlicher oder weniger stabil wäre als der locus INH-Resistenz.

Dem oben gemachten Einwand, daß eine echte Rückmutation auch im Doppelröhrchenversuch hätte auftreten müssen, können wir mit dem Hinweis auf die bereits zitierte Arbeit von Kaudewitz u. Mitarb. (S. 73) begegnen, der sowohl die kerninaktivierende (wachstumshemmende oder tötende), als auch die mutative Wirkung von P-32-Atomen nicht als Folge ionisierender ß-Strahlung ansieht, sondern beide Phänomene auf die Umwandlung der in die lebende Substanz der Bakterienzelle (DNS ?) eingebauten P-32- in S-32-Atome zurückgeführt. Auch das Fehlen des Phänomens der "Resensibilisierung", wenn im Anschluß an die P-32-Exposition eine Subkultur auf inaktiven Nährböden eingeschaltet wird, spricht nicht mit Sicherheit gegen eine echte Rückmutation. Wir wissen, daß eine Mutation keineswegs immer am Ende der Bestrahlung schon "fertig", d. h. stabil ist, daß sich vielmehr die Gene oder die Zellkomponenten außerhalb des Gens in einem sogenannten "prämutativen" Stadium befinden (s. 1, S. 8), aus dem sich nur bei der sogenannten "perfektionierenden" Nachbehandlung die dauerhafte Genänderung entwickelt, während bei Nachbehandlung mit "Reversionsmitteln" eine Rückkehr zum unmutierten Zustand erfolgt. Am bekanntesten ist die Photoreversion nach UV-induzierten Mutationen, aber auch nach Röntgen-Bestrahlung ist eine Reversion z. B. durch bestimmte Chemikalien gesichert. Spezielle Untersuchungen hierüber in Bezug auf die mutagene Wirkung des Radio-Phosphor scheinen noch nicht vorzuliegen. Hier deutet sich ein weiterer Ansatzpunkt für experimentelle Arbeiten an.

Damit sind wir am Ende unserer Betrachtungen. Wir haben versucht, unsere Ergebnisse in den Bereich der Strahlenbiologie der Mikroorganismen einzuordnen und auf die Richtung hinzuweisen, in der ein weiteres experimentelles Vorgehen lohnend erscheint.

5 Zusammenfassung

Die Einwirkung von radioaktivem Phosphor auf Tuberkulosebakterien wurde an acht verschiedenen TB-Stämmen untersucht, die durch Pathogenität beim Meerschweinchen, Wachstum in Gegenwart und Abwesenheit von Glyzerin, Katalase-Reaktion und Chemoresistenz bzw. -sensibilität für Streptomycin, Para-Aminosalizylsäure, Conteben und Isoniazid charakterisiert waren.

Die Untersuchungen wurden in einem Aktivitätsbereich von 10 - 100 µc/ml Nährboden (Hohn-Substrat 4) durchgeführt und betrafen:
Das Wachstum der Kolonien auf P-32-haltigen Nährböden,
die Katalaseaktivität und
die Chemosensibilität bzw. -resistenz gegen Streptomycin, p-Aminosalizylsäure, Conteben und Isoniazid vor und nach Exposition der Stämme auf P-32-haltigen Nährböden.

Die Wachstumsversuche ergaben bei einigen Stämmen eine reproduzierbare, von der Aktivitätskonzentration im Nährboden abhängige Wachstumshemmung, bei anderen ein bis zur maximalen Aktivitätskonzentration von 100 µc/ml nicht gehmmtes Wachstum. In keinem Falle wurde ein vollständiges Sistieren des Kolonienwachstums beobachtet. Die niedrigste Aktiviitätskonzentration, bei der eine Wachstumshemmung auftrat, betrug 40 µc/ml.

Die positive oder negative Katalaseaktivität der TB wurde durch Exposition auf P-32-haltigen Nährböden nicht beeinflußt. Eine auf Grund des sogen. "Sauerstoffeffektes" zu vermutende "Strahlenschutzwirkung" des Katalasegehaltes der TB war nicht eindeutig feststellbar: von den drei wachstumsgehemmten Stämmen war einer Katalase-positiv, von den vier nicht wachstumsgehemmten Stämmen waren zwei Katalase-negativ.

Die Versuche über die Beeinflussung der Chemosensibilität durch P-32 zeigten im gegebenen Dosisbereich weder bei den im Wachstum gehemmten, noch bei den ungehemmten Stämmen eine Veränderung des Hemmtiters: d. h. es war keine durch P-32 induzierte Erhöhung der Mutationsrate (zur Chemoresistenz) zu beobachten. Ebenso blieb die INH-Resistenz (2 Stämme) durch P-32 unbeeinflußt. Dagegen trat bei der PAS-Resistenz (2 Stämme) nach P-32-Exposition der Kulturen auf Nährböden mit einer Aktivitätskonzentration von mehr als 50 µc/ml ein Hemmtiterabfall, also das Phänomen der "Resensibilisierung" auf.

Mit Hilfe einer besonderen Versuchsanordnung ("Doppelröhrchenversuch") konnte nachgewiesen werden, daß sowohl der wachstumshemmende als auch der "resensibilisierende" Effekt des P-32 ausblieb, wenn die radioaktive Lösung nicht direkt mit dem Nährboden vermischt, sondern in einem durch den Nährboden geführten Glasröhrchen enthalten war.

Daraufhin durchgeführte Versuche über die P-32- Aufnahme der TB-Kolonien als mögliche Voraussetzung für das Auftreten der beobachteten strahlenbiologischen Wirkungen (Wachstumshemmung und PAS-"Resensibilisierung") hatten wegen der angewandten groben Methodik (Membranfilterkulturen auf Nährböden wechselnder Zusammensetzung) und wegen der zu kleinen Zahl der Proben nur orientierenden Charakter. Eine ergänzende Untersuchung mit adäquater Methode zur Frage der Korrelation zwischen P-32-Aufnahme und strahlenbiologischem Effekt erscheint aber lohnend.

Eine andere Deutungsmöglichkeit des "Doppelröhrchen"-Versuches, daß nämlich die obengen. strahlenbiologischen Effekte von der Qualität der Strahlung abhängig sind, die im Doppelröhrchen infolge der ß-Strahlen-Absorption in der Glasschicht verändert war, regt ebenfalls zu der neuen experimentellen Aufgabenstellung an, durch Anwendung ionisierender Strahlengemische anderer Qualität (z. B. Röntgenstrahlen) nachzuprüfen, wie weit die in unseren Versuchen bei den TB hervorgerufenen strahlen-biologischen Phänomene an eine bestimmte Strahlenqualität gebunden sind.

Bei der abschließenden Erörterung unserer Beobachtungen wurde versucht, die Beziehung unsere Ergebnisse zu den bisher in der Strahlenbiologie der Mikroorganismen erarbeiteten Hypothesen herzustellen.

6 Literaturverzeichnis

ALEXANDER, P.: in: Bacq, Z. M. und P. Alexander, Deutsche Übers. hersg. von H. -J. Maurer: Grundlagen der Strahlenbiologie. Thieme Stuttgart 1958

ASCHOFF, L. und P. DIEPGEN: Kurze Überischtstabelle zur Geschichte der Medizin. J. F. Bergmann München 1943

AVERY: zit. nach Boivin

BASSERMANN, Friedrich: Probleme der Morphologie, Cytochemie und Wuchsform des Tuberkuloseerregers. Thieme Stuttgart 1953

BERNHEIM: zit. nach Lehmann

BÖNICKE, Rudolf: Die Katalase-Aktivität INH-sensibler und -resistenter Mycobacterien und ihre Hemmbarkeit durch INH. Naturwissensch. 41, 430 (1954)

BOIVIN, André: Zbl. Bakt. I Orig. 155 (1950), 58 - 75 Bakterien-Genetik

BRACHET, J. (zit. nach Bassermann) Der histochemische Nachweis der Pentosenucleinsäuren. C. R. Séances Soc. Biol. Filiales Associés 133 (1940)

DELBRÜCK, FANNO und LURIA: zit. nach Gottschewski

DEMEREC, M. (zit. nach Kaplan) Induced mutations and possible mechanism of the transmission of heredity in E. coli. Proc. Nat. Acad. Sc. 37 (1946), 36 -46

DEMEREC, M. und R. LATARJET: Mutations in bacteria induced by radiations. Cold Spring Harbor Symp. 11(1947), 38 - 50

DOMAGK, G.: Die Chemotherapie derTuberkulose mit Thiosemicarbazonen. G. Thieme Stuttgart 1950

DZK zur Bekämpfung der Tuberkulose in: Tuberkulose-Jahrbuch des DZK 1952/53 Springer Berlin-Göttingen-Heidelberg 1954

ELY, J. O.: Notes from the Biochemical Research Foundation. Distribution in the Rat of Injected Radioactive Bacteria. J. of the Franklin Inst. 234 (1942), 500 ff.

FEULGEN und ROSSENBECK: (zit. nach Bassermann) Hoppe-Seylers Zschr. 135 (1924), 203

FONTÈS, A.: Über die Filtrierbarkeit des Tuberkulosevirus vom Standpunkt des Polymorphismus. Beitr. Klin. Tbk. 77 (1931), 2-15

FRAENKEL-CONRAT, B. A. SINGER und R. C. WILLIAMS: A Symposion on the Chemical Basis of Heredity 501 - 512 (Baltimore 1957)

FREERKSEN, E. und J. MEISSNER: Tierversuche über Aufnahme und Verteilung von radioaktivem Phosphat. Z. exper. Med. 120 (1952/53), 190 - 210

GIERER, A. und G. SCHRAMM: Infectivity of ribonucleic acid from Tabacco Mosaic Virus Nature 177 (1956), 702-703

GOTTSCHEWSKI, G.: Die Genetik der Mikroorganismen Zbl. Bakter. I. Orig. 155 (1950), 31 - 58

GRIFFITH: zit. nach Boivin

HAAS. F. L., J. B. CLARK, O. WYSS u. W. S. STONE: Mutations und Mutagenic Agents in Bacteria. Amer. Nat. 84 (1950), 261-274

HALLMANN, Lothar: Bakteriologie und Serologie. Thieme Stuttgart 1955

HARM, W.: Neuere Ergebnisse der Virus-Genetik. Dtsch. med. Wschr. 83 (1958), 509-511

HARM, W.: Neuere Ergebnisse der Bakterien-Genetik. Dtsch. med. Wschr. 83 (1958) 851-854

HARM, W.: Strahlengenetik der Bakteriophagen in: Strahlenbiologie, Strahlentherapie, Nuklearmedizin und Krebsforschung, Ergebnisse 1952-1958, Hrsg. Schinz, Holthusen, Langendorf, Rajewsky und G. Schubert Thieme Stuttgart 1959

HAYES, W.: Genetic recombination in Bact. coli K 12: analysis of the stimulating effect of ultraviolet light Nature Dis. J. London 169 (1952), 1017-1108

HEILMEYER, Ludwig: Das Resistenzproblem in der Chemotherapie. Erg. ges. Tbkforschg. Band XIII Thieme Stuttgart 1956

HEISENBERG, W. Das Naturbild der heutigen Physik. rowohlts deutsche enzyklopädie Nr. 8 (1956)

HELLER, Alfr., Rob. H. EBERT, Dieter KOCH-WESER u. Lloyd J. ROTH:	Studies With C-14 Labeled Para-Aminosalicylic Acid and Isoniazid Amer. Rev. Tbc 75, 71-82 (1957)
HENNEBERG, G.:	Beitrag zur Resistenzfrage. Zbl. Bakter. I. Orig. 160 (1954), 274-275
HENNEBERG, G. und Brig. CRODEL:	Untersuchungen an Membranfiltern Zbl. Bakter. I. Orig. 160 (1954), 605-613
HEVESY, George:	(zit. nach Hiller-Jakob) Radioactive Indicators. Interscience Publ., New York 1948
HILLER, J. u. A. JAKOB:	Die Radio-Isotope. Band 28 Sonderbände zur Strahlentherapie. Urban & Schwarzenberg München und Berlin 1952
HOFF, Ferd.:	Klinische Physiologie und Pathologie. Thieme Stuttgart 1952
HOLLAENDER, A.:	(zit. nach Kaplan) Wave-length dependace of the production of mutations in fungus spores by monochromatic UV-radiation (2180-3650 Å) J. Genet. Suppl. 1941. 128 (1939), 153-154
JACOB, F. und E. L. WOLLMANN:	Etude génétique d'un bactériophage tempéré d'Escherichia coli. - III. Effet du rayonnement ultraviolet sur la récombination génétique. Ann. Inst. Pasteur 88 (1955) 724-749
KAPLAN, R. W.:	Mutation und Keimtötung bei Bact. coli histidinless durch UV und Photodynamie. Naturwissensch. 37 (1950), 547
KAPLAN R. W.:	Genetische Wirkungen durch UV und Licht. Strahlentherapie 86 (1951/52) 157-163
KAPLAN, R. W.:	Neuere Entwicklungen in der Mikrobengenetik. Zbl. Bakter. I Orig. 160 (1954), 181-193
KAPLAN, R. W.:	Strahlengenetik der Mikroorganismen in: Strahlenbiologie, Strahlentherapie, Nuklearmedizin und Krebsforschg. Ergebnisse 1952-1958 Hrsg. Schinz, Holthusen, Langendorf, Rajewsky und G. Schubert Thieme Stuttgart 1959

KAUDEWITZ, F., W. VIELMETTER und H. FRIEDRICH-FREKSA : Mutagene Wirkung des Zerfalls von radioaktivem Phosphor nach Einbau in Zellen von Escherichia coli. Z. Naturforschg. 13 b (1958), 793-802

KOCH-WESER, Dieter: The Usefulness of C-14 Labeled Compounds in Tuberculosis Research. IV. Internationaler Kongress für Erkrankungen der Thoraxorgane 19. -23. 8. 56 in Köln

KÖLBEL, Herm.: Untersuchungen am Mycobact. tuberculosis I. Säurefestigkeit, Vermehrung und Granulation Zeitschr. f. Hygiene 133 (1951), 45-57

KÖLBEL, Herm.: Untersuchungen am Mycobact. tuberculosis IV. Elektronenoptischer Nachsweis von Konjunktionen. Z. Naturforschg. 12 b (1957), 444-447

LABAW, L. W., V. M. MOSLEY und R. W. G. WYCKOFF : Radioactive Studies of the Phosphorus Metabolism of Escherichia coli. J. Bacter. (Am) 59 (1950), 251-262

LEDERBERG, J. E. u. L. TATUM: (zit. nach Harm) Nature 158 (1946), 558

LEHMANN, J.: Para-Aminosalicylic Acid in the Treatment of Tuberculosis. Lancet 1946, No. 6384, p. 15

LEHNARTZ, Emil: Einführung in die chemische Physiologie 7. Aufl. Springer Berlin u. Heidelberg 1947

LEVI, Hilde: Documenta Geigy. Wissenschftl. Tabellen 1955, S. 94 Die Anwendung der künstlich radioaktiven Isotope in Medizin und Biologie.

LINCOLN, R. E.: (zit. nach Kaplan) Production and rate of mutation in Phytomonas stewardii by x-radiation. Genetics 25 (1940), 125 (abstr.)

LURIA, S. E. und DELBRÜCK, M.: (zit. nach Boivin) Genetics 28 (1943), 491

MEISSNER, G.: Methoden und Ergebnisse von Resistenzbestimmungen gegen Streptomycin an Tuberkelbakterien aus Sputen bei Lungentuberkulose. I. Teil. Methoden Beitr. Klin. Tbk. 106 (1952), 518-532

MEISSNER, G. u. G. BERG: Methoden und Ergebnisse von Resistenzbestimmungen gegen Streptomycin an Tuberkelbakterien aus Sputen bei Lungentuberkulose. II. Teil A. Bakteriolog. Ergebnisse von G. Meissner B. Klinische Ergebnisse von Gunnar Berg/Beitr. KlinTbk. 109 (1953), 303-321

MEISSNER, J.: Radioisotope bei Markierungs- und Stoffwechselversuchen an Bakterien. Atompraxis 2 (1956), 85-92

MEISSNER, J. und W. DILLER: Über die Aufnahme von Ortho- und Metaphosphat durch das Mycobacterium tuberculosis. Z. Hygiene 137 (1953), 518-539

MEISSNER, J. und Fr. KROPP: Über die Phosphatresorption beim Mycobacterium tuberculosis. Z. Hygiene 137 (1953), 429-439

MEISSNER, J. und J. LEMKE: Über die Aufnahme P-32-markierter kondensierter Phosphate bei BCG- und H 37- Stämmen von Mycobacterium tuberculosis. Z. Hygiene 141 (1955), 249-266

MIDDLEBROOK, G.: Isoniacid-Resistance and Catalase Acitivity of Tubercle Bacilli. Amer. Rev. tbc. 69 (1954), 471-472

MIDDLEBROOK, G., M. L. COHN and W. B. SCHAEFER: Studies on Isonicid and Tubercle Bacilli. III. The Isolation, Drug-Susceptability, and Catalase-Testing of Tubercle Bacilli from Isoniacid-Treated Patients. Amer. Rev. tbc. 70 (1954), 842-872

MÜLLER, Herm.: Ergebnisse blutchemischer Untersuchungen bei Tuberkulose. 3. Mitteilung: Kalzium, Kalium, Phosphor. Z. ges. Innere Medizin 9 (1954), 719 ff.

MULLER, H. J. (zit. nach Nachtsheim) The production of mutations by X-rays Proc. Nat. Acad. Sc. 14 (1928), 714-726

NACHTSHEIM, Hans: Die Schädigung des menschlichen Erbgutes durch physikalische und chemische Einwirkungen. Jahrbuch 1958 der Max-Planck-Ges. 102-126

OPITZ (Mainz): Untersuchung über die tatsächliche Häufigkeit offener Lungentuberkulose im Kindesalter. Beitr. Klin. Tbk. 82 (1933), 296-340

PIEKARSKI, G. und ROBINOW: (zit. nach Bassermann)

POTHMANN, Franz-Josef: Das Prinzip der Populationsheterogenität und seine Auswirkung auf Medizin und Biologie. Dtsch. med. Wschr. 81 (1956), 1574-158

POTHMANN, Franz-Josef: Bakteriologische Studien über die Resistenz des Mycobacterium tuberculosis gegen Streptomycin und andere Tuberculostatica. Erg. Hygiene 29 (1955), 248-393

ROSS, O.A.: The Use of Radioactive Phosphorus as a Tracer in Hemolytic Streptococci J. of Immunology 43-45 (1942), 329-336

ROULET F.: zit. nach Kölbel

SCHADE, Heinrich: zit. nach Aschoff-Diepgen

SCHLOSSBERGER und BRANDIS : Über genetische Vorgänge bei Bakterien. Klin. Wschr. 28 (1950), 1-3

SCHOENHEIMER und RITTENBERG : The study of the intermediary metabolism of animals with the aid od isotopes. Physiol. Rev. 20, (1940), 218 (zit. nach Lehnartz)

SOMMERMEYER, K.: Quantenphysik der Strahlenwirkung in Biologie und Medizin. Akad. Verlg. Ges. Geest & Portig K. G. 1952

SOMMERMEYER, K. : Die Entwicklung der Treffertheorie seit dem Jahre 1946 unter besonderer Berücksichtigung ihrer Anwendung auf die biologische Wirkung energiereicher Strahlen in: Strahlenbiologie, Strahlentherapie, Nuklearmedizin und Krebsforschung Ergebnisse 1952-1958 Hrsg. Schinz, Holthusen, Langendorf, Rajewsky und G. Schubert Thieme Stuttgart 1959

SPIESS, H. und H. POPPE : Nachweis radioaktiv markierter Bakterien im Organismus. Klin. Wschr. 32 (1954), 185-186

SPIESS, H. und H. POPPE : Weitere Untersuchungen mit radioaktiv markierten Bakterien im Rahmen der Tuberkulose-Schutzimpfung. Klin. Wschr. 32 (1954), 186-187

STENT, Gunther S.: Decay of Incorporated Radioacitve Phosphorus During Reproduction of Bacteriophage T2 J. Gen. Physiol. 38 (1955) 853-865

STENT, Gunther S. and Clarence R. FUERST : Inactivation of Bacteriophages by Decay of Incorporated Radioactive Phosphorus. J. Gen. Physiol. 38 (1955), 441-458

STRÖM, Lars und Lars RUDBÄCK : On Labeling Tubercle Bacteria with Radioactive Phosphorus. Acta tuberculosea Scand. Suppl. XXI (1949)

STRÖM, L. und G. WIDSTRÖM :	Quelques expériences concernant l'immunité antituberculeuse, effectuées à l'aide de bacilles radioactifs. Acta Paediatr. 40 (Mai 1951) 213-217
UNVERRICHT, W., A. KOEHN, H. OESER, K. SCHATTMANN und H. G. MEHL :	Die Bindung von radiaktivem Penicillin in gesunden und kranken Tierorganen sowie Aufschwemmung und Kulturen von empfindlichen und resistenten Bakterien. Zbl. Bakter. I Orig. 166 (1956), 153-172
VIETINGHOFF-SCHEEL, Otto Frhr. v. :	Resistenzbestimmungen von Tuberkelbakterien gegen Streptomycin, p-Aminosalizylsäure, Conteben, Isonikotinsäurehydrazid und Paratebin. Beitr. Klin. Tbk. 108 (1953), 490-501
WEBER, E. :	Grundriß der biologischen Statistik. Fischer Jena 1948
ZILLI, W. :	Übersicht: Die biologische Funktion der Ribonukleinsäure. Neuere Befunde der Virusforschung. Dtsch. med. Wschr. 82 (1957), 1925-1926
ZINDER, N. D. und J. LEDERBERG :	(zit. nach Harm) J. Bact. 64 (1952), 679

Zum Schluß möchte ich allen danken, die mir bei dieser Arbeit die Wege geebnet haben.
Ganz besonders gilt mein Dank dem Chefartz der Strahlenabteilung des Städt. Auguste-Viktoria-Krankenhauses in Berlin-Schöneberg, Herrn Priv.-Doz. Dr. med. W. Frommhold und Frau Oberärztin S. V. Haugwitz, welche während der Abwesenheit des Chefarztes in den U. S. A. die Strahlenabteilung geleitet hat.

Herrn Obermedizinalrat Dr. Sylvester, dem Leiter des Medizinaluntersuchungsamtes III im Auguste-Viktoria-Krankenhauses, bin ich für die Überlassung der untersuchten TB-Stämme sowie für die großzügige Einräumung eines bakteriologischen Arbeitsplatzes verpflichtet. Ebenso danke ich dem damaligen Physiker der Strahlenabteilung, Herrn Dr. ing. E. Szabó de Bucs, für seine tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung der Versuche. Schließlich seien außer den Hilfskräften der Nährbodenküche die techn. Assistentinnen des MUA III, unter ihnen in erster Linie Frau Ruth Onnen, genannt, die sich verantwortungsbewußt um die Pflege und Erhaltung der Kulturen gekümmert und beim Ansetzen der Resistenzbestimmungen mitgeholfen hat.

Lebenslauf

Am 31. 10. 1920 wurde ich als Tochter des damaligen Staatsanwaltes Hermann Loerbroks und seiner Ehefrau Elsbeth, geb. Janssen in Berlin geboren. Meine Schulzeit spielte sich in Berlin, Hannover und wieder Berlin ab, wo ich im März 1939 an der Fichtenbergschule in Berlin-Steglitz das Abitur machte. Nach Ableistung des Pflichtarbeitsdienstes von April bis November 1939 studierte ich von Januar 1940 an in Berlin, Freiburg i. Br., Wien, Berlin, Tübingen und Marburg/Lahn Medizin und beendete das Studium im Frühjahr 1945 mit dem medizinischen Staatsexamen in Marburg/Lahn. Die Pflichtassistentenzeit absolvierte ich in Marburg/Lahn an der Universitätsfrauenklinik, der chirurgischen und medizinischen Universitätsklinik und der medizinischen Universitätspoliklinik von 1945 bis 1947.

Im Sommer 1947 kehrte ich nach Berlin zurück und arbeitete hier vom 1. 12. 1947 bis 31. 7. 1957 im Städtischen Auguste-Viktoria-Krankenhaus in Berlin-Schöneberg als Assistenzärztin zunächst der 1. medizinischen und Tuberkulose-Abteilung, ab 1951 der Strahlenabteilung. Ich erwarb die Fachartzanerkennung für Lungenkrankheiten sowie für Strahlenheilkunde.

Seit dem 1. 8. 1957 bin ich als Leiterin der Röntgenabteilung in der Städtischen Klinik für Lungenkranke Heckeshorn in Berlin-Wannsee (Chefartz Dr. K. Auersbach) tätig.